

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA**  
**ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA – EST**  
**CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**DANIEL DAVID FRANCO PEREIRA**

**EXTRAÇÃO DE XILANASES PRODUZIDAS POR FUNGO**  
**ENDOFÍTICO UTILIZANDO SISTEMA MICELAR REVERSO**

MANAUS

2021

**DANIEL DAVID FRANCO PEREIRA**

**EXTRAÇÃO DE XILANASES PRODUZIDAS POR FUNGO  
ENDOFÍTICO UTILIZANDO SISTEMA MICELAR REVERSO**

**Monografia apresentada ao Curso de  
Graduação em Engenharia Química da  
Escola Superior de Tecnologia da  
Universidade do Estado do Amazonas,  
para a obtenção do título de Bacharel em  
Engenharia Química.**

Orientador: Profa. Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque

MANAUS

2021

**DANIEL DAVID FRANCO PEREIRA**

**EXTRAÇÃO DE XILANASES PRODUZIDAS POR FUNGO  
ENDOFÍTICO UTILIZANDO SISTEMA MICELAR REVERSO**

**Monografia de Conclusão de Curso para obtenção do título de Engenheiro, Habilitação em  
Engenharia Química – Escola Superior de Tecnologia, Universidade do Estado do  
Amazonas**

**Banca examinadora:**

*Patricia Albuquerque*

**Profa. Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque - Orientadora**

*Lucas de Souza Falcão*

**Prof. Dr. Lucas, de Souza Falcão - UNIFESP**

*Erica Souza*  
Prof.ª Érica Simplicio de Souza  
Professor Adjunto  
Curso de Engenharia Química  
Escola Superior de Tecnologia - EST  
Universidade do Estado do Amazonas - UEA

**Profa. Dra. Érica Simplicio de Souza – UEA**

**Conceito: APROVADO**

**Manaus, 17 de dezembro de 2021.**

## **DEDICATÓRIA**

*Mesmo sem falar, comunicando-se com o olhar, com os gestos e com o rabo que não para de abanar, meu amigo Abu você é o meu gênio da lâmpada.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por ter me abençoado dia após dia com sua infinita misericórdia e por ter me dado o dom da vida;

Agradeço aos meus pais, os quais têm me instruído continuamente com todo o seu esforço e dedicação;

Agradeço ao meu irmão e a minha avó pelo carinho de sempre;

Agradeço à minha professora e Mestre Patrícia Melchionna Albuquerque, por toda a sua ajuda durante a etapa de desenvolvimento do trabalho, pela sua paciência e por ter confiado em mim;

Eu também agradeço aos meus amigos e colegas que me acompanharam durante todo este período de graduação, de dúvidas e incertezas e que de uma forma ou outra, sempre contribuíram para que eu chegasse até aqui;

À coordenação do curso de Engenharia Química, que nunca mediram esforços para nos ajudar e sempre vibraram com nossas conquistas;

À Universidade do Estado do Amazonas – UEA por todo suporte durante todos esses anos, tanto pela estrutura física quanto pelo corpo docente e apoio em todos os momentos;

E por fim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que a conclusão deste projeto se tornasse possível.

Muito obrigado!

## RESUMO

As enzimas são proteínas que catalisam com grande eficiência diversas reações bioquímicas, sendo cruciais para a viabilidade de processos industriais e biotecnológicos devido à sua alta especificidade. As xilanases (EC 3.2.1.8) são enzimas hidrolíticas produzidas por diversos microrganismos, responsáveis pela decomposição da parede celular das plantas, com grande aplicabilidade em processos industriais, como na produção de rações, de papel e alimentos. Essas enzimas têm sido extensivamente estudadas, visto que apesar das suas mais variadas aplicações, o seu custo elevado, sua instabilidade e também sua difícil purificação a partir do meio de cultivo limitam sua comercialização. A busca por métodos eficazes de extração e recuperação de enzimas com reduzida perda de sua atividade, portanto, é de grande relevância. Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a produção de xilanases a partir do cultivo em meio líquido de um fungo endofítico amazônico e investigar o uso do método de extração líquido-líquido por Sistema Micelar Reverso (SMR) na recuperação da atividade enzimática. A influência de diferentes concentrações do agente tensoativo catiônico brometo de hexadecil-trimetilamônio (CTAB) e da força iônica no meio utilizado para a extração foram estudadas a partir de um planejamento experimental do tipo DCCR. O fungo *Aspergillus* sp. F36 foi cultivado em meio líquido contendo xilana a 1% durante 48h. Após a separação do micélio, o extrato enzimático foi utilizado para a extração líquido-líquido por SMR. A concentração proteica e a atividade enzimática foram determinadas nas amostras antes e após a extração. Foi detectada a produção de xilanases no caldo fermentado (6,87 U/mL) e após a extração líquido-líquido por SMR, em todas as condições estudadas. O ensaio com 0,564 M de CTAB e 12,0 mS/cm de força iônica promoveu a maior recuperação da atividade enzimática (202,7%). Foi demonstrado que a recuperação das xilanases por intermédio de extração por SMR apresentou valores críticos no ponto de mínimo de 0,47 M para o tensoativo e 13,830 mS/cm de força iônica, de acordo com equação obtida no modelo matemático. O valor de rendimento total de proteínas (np) demonstrou que o método apresenta uma alta seletividade na extração da enzima nas condições estudadas, além de favorecer a manutenção de sua integridade, o que também foi observado pelo aumento no fator de purificação. As condições experimentais testadas não inibiram a atividade enzimática das xilanases após a extração pelo SMR, indicando, portanto, que o método pode ser utilizado para a recuperação dessas enzimas do meio de cultivo fúngico. Com este estudo conclui-se que o método SMR pode ser utilizado para o isolamento da enzima de interesse e que o tensoativo catiônico CTAB em sua maior concentração testada promove um maior rendimento da enzima na extração por SMR.

**Palavras-chaves:** Xilanase, extração enzimática, tensoativo, força iônica, micelas reversas.

## ABSTRACT

Enzymes are proteins that catalyze with great efficiency several biochemical reactions, being crucial for the viability of industrial and biotechnological processes due to their high specificity. Xylanases (EC 3.2.1.8) are hydrolytic enzymes produced by several microorganisms, responsible for the decomposition of plant cell walls, with great applicability in industrial processes, such as in the production of feed, paper and food. These enzymes have been extensively studied, since despite their varied applications, their high cost, their instability, and also their difficult purification from the culture medium, limit its commercialization. The search for efficient methods of extracting and recovering enzymes with reduced loss of activity, therefore, is of great relevance. In this context, the objective of this work was to evaluate the production of xylanases from the cultivation in liquid medium of an Amazonian endophytic fungi, and to investigate the use of the liquid-liquid extraction method by Reverse Micellar System (RMS) in the recovery of the enzymatic activity. The influence of different concentrations of the cationic surfactant hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) and the ionic strength in the medium used for the extraction were studied, through a RCCD experimental design. The *Aspergillus* sp. F36 was cultured in liquid medium containing 1% xylan for 48 h. After separating the mycelium, the enzymatic extract was used for liquid-liquid extraction by RMS. Protein concentration and enzymatic activity were determined in the samples before and after extraction. The production of xylanases was detected in the fermented broth (6.87 U/mL) and after liquid-liquid extraction by RMS under all conditions studied. The assay with 0.564 M of CTAB and 12.0 mS/cm of ionic strength promoted the greatest recovery of the enzymatic activity (202.7%). It was demonstrated that the xylanases recovery through RMS extraction presented critical values at the minimum point of 0.47 M for the surfactant and 13.830 mS/cm of ionic strength, according to the equation obtained in the mathematical model. The value of total protein yield (np) showed that the method has a high selectivity in extracting the enzyme under the conditions studied, in addition to favoring the maintenance of its integrity, which was also observed by an increase in the purification factor. The experimental conditions tested did not inhibit the enzymatic activity of xylanases after extraction by the RMS, indicating the method for recovering these enzymes from the fungal culture medium. With this study, it is concluded that the RMS method can be used for the isolation of the enzyme of interest and that the cationic surfactant CTAB in its highest concentration tested promotes a higher yield of the enzyme in the extraction by RMS.

**Keywords:** Xylanase; enzyme extraction, tensioactive agents, ionic force, reversed micelles.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Enzimas xilanolíticas envolvidas na degradação da xilana.....	21
Figura 2 -	Esquema representativo da estrutura de um tensoativo.....	30
Figura 3 -	Representação esquemática da formação de micelas com o aumento. da concentração de tensoativo .....	32 32
Figura 4 -	Formação de micelas.....	33
Figura 5 -	Micelas direta (a) e inversa (b) .....	33
Figura 6 -	Fluxograma das etapas metodológicas utilizadas no presente trabalho	35
Figura 7 -	Fungo endofítico <i>Aspergillus</i> sp. F36, isolado de <i>Myrcia guianensis</i> (Myrtaceae) cultivado em meio ágar Sabouraud dextrose. A) Tubo de ensaio e B) placa de Petri.....	36 36
Figura 8 -	Cultivo do fungo <i>Asergillus</i> sp. F36 em meio líquido em shaker, a ... 28°C durante 48 horas.....	37 37
Figura 9 -	Representação da etapa de extração da xilanase por micelas reversas	38
Figura 10 -	Representação da etapa de re-extração da xilanase por micelas ..... reversas.....	39 39
Figura 11 -	Extração líquido-líquido para separação da xilanase. A) Solução de... CTAB; B) Extração antes de agitação; C) Extração após agitação em vortex; D) Re-extração.....	39 39 39
Figura 12 -	Ensaio de atividade enzimática.....	42
Figura 13 -	Dosagem de proteínas pelo método de Bradford.....	42
Figura 14 -	Curva padrão de xilose utilizada para a quantificação da atividade.... enzimática, conforme o método de Miller (1959).....	45 45
Figura 15 -	Curva padrão de albumina do soro bovino (BSA), utilizada na..... quantificação de proteínas pelo método de Bradford (1976).....	46 46
Figura 16 -	Diagrama de Pareto para as variáveis tensoativo e força iônica ..... quanto à atividade enzimática específica de xilanase após extração.... por SMR.....	51 51 51
Figura 17 -	Superfície de resposta para atividade específica de xilanase (U/mg)...	52

	Em função das variáveis estudadas (tensoativo CTAB e força iônica)	52
Figura 18 -	Superfície de resposta para a atividade específica de xilanase (U/mg)	52
	Após extração por micela reversa, em função da concentração de.....	52
	CTAB e da da força iônica.....	52
Figura 19 -	Diagrama de Pareto para as variáveis utilizadas no estudo.....	53
	experimental (tensoativo e força iônica), quanto ao % de recuperação	53
	da xilanase (Y), após extração por SMR.....	53
Figura 20 -	Superfície de resposta para o rendimento expresso em atividade ou....	56
	recuperação da xilanase (Y) em função das variáveis estudadas.....	56
	(tensoativo e força iônica).....	56
Figura 21 -	Superfície de resposta para o rendimento da extração de xilanase por..	57
	micela reversa em função da concentração de CTAB e da força iônica.	57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Agentes tensoativos utilizados na extração líquido-líquido de proteínas e respectivo rendimento de extração* .....	28
Tabela 2 - Níveis das variáveis avaliadas no Delineamento Composto Central..... Rotacional.....	40
Tabela 3 - Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional para o estudo das condições de recuperação de xilanase fúngica por micelas reversas de..... CTAB.....	41
Tabela 4 - Atividade enzimática e concentração de proteínas totais após a extração da xilanase pelo método ELL por SMR, nos diferentes ensaios do DCCR.....	48
Tabela 5 - Resultados obtidos nos ensaios do Delineamento Composto Central..... Rotacional, para avaliação das melhores condições de extração de xilanase fúngica.....	49
Tabela 6 - Efeitos estimados para a recuperação da atividade de xilanase (Y), obtidos. a partir do planejamento experimental DCCR*.....	54
Tabela 7 - Efeitos estimados para os fatores analisados no processo de extração de.... xilanase por micelas reversas*.....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOT	Bis (2-etilhexil) sulfosuccinato de sódio
BDBAC	Cloreto de trioctilmetil amônio
CMC	Concentração Micelar Crítica
CTAB	Cloreto de benzil dodecil bis (hidroxietil) amônio/brometo de hexadecil-trimetilamônio/ brometo de cetrimônio $[(C_{16}H_{33})N(CH_3)_3]Br$ ; brometo de cetiltrimetilamônio
DAB	4 dodecilmetil amônio butirato
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
ELL	Extração Líquido-Líquido
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
IE	Índice enzimático
IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
MP	Mega Pascal
PL	Ponto isoelétrico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SMR	Sistema Micelar Reverso
Triton	Éter mono [p- (1, 1, 3,3-tetrametilbutil) fenílico] de polietilenglicol
UEA	Universidade do Estado do Amazonas

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
2.1 BIOMOLÉCULAS DE INTERESSE INDUSTRIAL.....	17
2.2 ENZIMAS.....	18
<b>2.2.1 Fatores reguladores da atividade enzimática</b> .....	19
<b>2.2.2 Classificação das enzimas</b> .....	20
2.3 XILANASES.....	21
2.4 FUNGOS ENDOFÍTICOS PARA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS....	23
2.5 PROCESSOS DE RECUPERAÇÃO DE ENZIMAS.....	25
2.6 MÉTODO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO (ELL) .....	26
2.7 TENSOATIVOS.....	30
<b>2.7.1 Classificação dos Tensoativos</b> .....	34
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	35
3.1 MICRORGANISMO.....	35
3.2 PRODUÇÃO DE XILANASE.....	36
3.3 EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO PARA SEPARAÇÃO DA XILANASE.....	37
3.4 ESTUDO DOS PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM A EXTRAÇÃO LÍQUIDO. LÍQUIDO (ELL) .....	40
3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE XILANASE.....	41
3.6 DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	42
3.7 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO.....	43
3.8 DETERMINAÇÃO DO FATOR DE PURIFICAÇÃO.....	44
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	45
4.1 CURVAS ANALÍTICAS.....	45
4.2 PRODUÇÃO DE XILANASE FÚNGICA.....	46
4.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	47
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	59

<b>6 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>60</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>61</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As enzimas são classes de proteínas que catalisam com grande eficiência diversas reações bioquímicas, sendo cruciais para a viabilidade de processos industriais e biotecnológicos devido à sua alta especificidade. Conhecidas por suas inúmeras aplicações em processos industriais, podem ser de origem animal, vegetal ou microbiana, sendo esta última a mais utilizada industrialmente (NELSON e COX, 2015).

Os processos industriais podem ser considerados como aqueles que possuem como objetivo a produção de bens e serviços e decorrem da aplicação de conhecimentos científicos básicos necessários à sua aplicação. Já os processos biotecnológicos são realizados devido a busca de novos processos que utilizem matérias-primas renováveis e de baixo custo, que são alternativas para o desenvolvimento de produtos mais competitivos e sustentáveis, além de serem alternativas aos processos já conhecidos e obtidos convencionalmente (NELSON e COX, 2015). Segundo um estudo da Organisation for Economic Co-operation and Development (OCDE), as aplicações industriais da biotecnologia em 2030 serão responsáveis por 39% do valor econômico gerado pelo setor, o que ilustra o forte investimento em pesquisa e alta expectativa de desenvolvimento nesta área (P-BIO, 2021).

Os processos biotecnológicos estão diretamente relacionados com o termo bioprocessos, que compreende um conjunto de operações que incluem o tratamento da matéria prima, o preparo dos meios de propagação e produção, a esterilização e a transformação do substrato em produto (s), os processos de produção, de separação e purificação de produto (s) e o processamento do produto. O bioprocessos é então considerado como a espinha dorsal da biotecnologia, um campo que reúne microrganismo, enzimas e nutrientes visando a produção de compostos bioativos de interesse industrial, podendo ser facilmente atrelado a produtos de origem renovável. Esta tecnologia traduz as descobertas científicas em soluções e produtos de relevância comercial, podendo trazer um salto na produção e na produtividade de processos já estabelecidos e de novos processos (LNBR/CNPEM, 2021).

Uma das etapas mais críticas nos bioprocessos está relacionada com a recuperação de proteínas ou outras moléculas sintetizadas por microrganismos, pois determina a pureza e a eficiência do processo, representando grande parte do gasto total (SCHMIDELL et al., 2016). Em se tratando de proteínas que possuem um grande potencial industrial, tem-se as xilanases,

que são enzimas com aplicação nas indústrias de alimentos e de papel, havendo relatos de seu uso na indústria de panificação desde a década de 70. A maioria das enzimas xilanolíticas são sintetizadas por bactérias e fungos, mas também podem ser encontradas em plantas, algas marinhas, protozoários, gastrópodes e artrópodes e sua função é hidrolisar os polissacarídeos não-amiláceos (COLLINS; GERDAY e FELLER, 2005; JUTURU e WU, 2014).

As xilanases microbianas são obtidas de modo geral a partir de meios complexos e de forma diluída. Somado a isto, sua extração requer a separação de compostos indesejáveis presentes no meio de fermentação, como células, componentes celulares, proteínas, sais, água e contaminantes em geral (RODRIGUES, 2001; MOURA et al., 2021).

A separação dos constituintes de uma mistura líquida composta de dois ou mais componentes é uma das situações mais comuns presentes no cotidiano dos engenheiros químicos. Este tipo de separação é possível através de vários métodos cuja aplicação é limitada de acordo com as características físicas e químicas dos componentes da mistura a ser separada, pelos custos de processo de separação e pelas condições disponíveis para a implantação do processo escolhido (SCHMIDELL et al., 2016). Entre os diversos métodos de separação, a extração líquido-líquido é uma técnica na qual ocorre a separação de produtos através do contato entre duas fases imiscíveis, com base na distribuição ou partição de um soluto entre duas fases fluidas. Sua aplicação em larga escala, inicialmente, teve como objetivo a remoção de hidrocarbonetos aromáticos do querosene, sendo adaptada para separação de produtos biológicos como proteínas e antibióticos (HASSMANN; PESSOA e ROBERTO, 2001).

Em função da alta seletividade, biocompatibilidade e rendimentos, o método de extração líquido-líquido pelo sistema de micelas reversas (SMR) vem sendo indicado para a extração de diversos tipos de proteínas. O processo de extração líquido-líquido pelo SMR é um fenômeno de transferência de massa, no qual a biomolécula em questão é transferida da fase aquosa para a fase micelar e que posteriormente sofre precipitação em uma re-extração. A operação depende da natureza do solvente, do co-solvente, tipo e concentração do tensoativo, condutividade elétrica, dentre outros fatores (GONZÁLEZ e RUIZ, 2017).

Considerando a ampla aplicação das xilanases em processos biotecnológicos e a necessidade de se recuperar de forma eficiente esta enzima do meio de cultivo, o presente

trabalho teve como objetivo geral avaliar a produção de xilanase a partir de um fungo endofítico e sua recuperação através da extração líquido-líquido em sistema micelar reverso.

Os objetivos específicos foram:

- Produzir xilanase a partir de cultivo em meio líquido de um fungo endofítico amazônico, isolado de *Myrcia guianensis*;

- Avaliar a influência de diferentes concentrações do agente tensoativo catiônico brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) e da força iônica no meio sobre a recuperação da enzima pelo método de extração líquido-líquido por SMR, a partir de um planejamento experimental;

- Determinar a atividade enzimática da xilanase fúngica, a atividade específica e o índice de purificação da enzima, a fim de determinar o melhor sistema para a recuperação da xilanase fúngica.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 BIOMOLÉCULAS DE INTERESSE INDUSTRIAL

Os produtos de origem microbiana, também conhecidos como biomoléculas ou ainda bioprodutos, variam desde os mais elaborados (como os usados em terapia gênica) até os mais convencionais (como o etanol obtido de fermentações) e correspondem a uma grande parcela dos produtos essenciais à sociedade atual. Tais produtos podem ser obtidos através de processos de bioconversão, síntese bioquímica ou extraídos de fontes naturais (NELSON e COX, 2015).

Os processos de bioconversão consistem na utilização de substratos por determinados microrganismos, como fungos e bactérias para a conversão em produtos que serão sintetizados de acordo com o metabolismo específico dos organismos utilizados (ORLANDELLI et al., 2012). Dentre os diversos produtos de importância industrial derivados do metabolismo microbiano, podem ser citados alimentos, aditivos usados na indústria alimentícia, bebidas fermentadas, pigmentos, enzimas de aplicação industrial, vitaminas, antibióticos, biocombustíveis, ácidos graxos, ácidos orgânicos, entre outros (KAVANAGH, 2005; POSCH; HERWIG e SPADIUT, 2013).

Os processos biotecnológicos são fundamentais para a obtenção desses compostos e se fundamentam com base no crescimento e multiplicação de células de microrganismos, as quais produzem produtos de interesse que podem estar presentes no interior das células (intracelular) ou serem excretadas para o meio resultante (extracelular). O produto desejado pode estar ligado ao micélio fúngico ou às células bacterianas, de acordo com suas características morfológicas. Se o produto se encontra no interior das células, as paredes celulares precisam ser rompidas para sua liberação. O rompimento dessas células pode ocorrer por calor ou mecanicamente, e os restos celulares removidos por centrifugação ou filtração. Posteriormente, quando o material está disponível no meio extracelular, o produto precisa ser separado do meio de fermentação e do material celular, usualmente feito por meio de extração líquida, centrifugação ou filtração, seguido de purificação (SUTHERLAND, 2011; SCHMIDELL et al., 2016).

A obtenção de biomoléculas se dá por meio de bioprocessos, também denominados processos fermentativos. Fermentação é qualquer processo no qual microrganismos são cultivados, mesmo sem que seja em condições aeróbicas. O processo de fermentação pode ocorrer em fermentadores ou biorreatores, os quais são reservatórios que fornecem aos microrganismos condições ideais de temperatura, pH e oxigênio, necessários para seu crescimento e produção dos produtos desejados. O cultivo pode ser realizado também em frascos próprios (do tipo Erlenmeyer), adaptando-se o mesmo às condições requeridas para o crescimento do microrganismo. As fermentações podem ser em estado sólido, conhecido como de superfície, e líquido/ submerso, sendo o último o mais comum (SCHMIDELL et al., 2016).

Portanto, a obtenção de biomoléculas requer um conhecimento prévio acerca do microrganismo utilizado, as condições de cultivo e controle das variáveis de processo. Os meios de cultura microbiológica devem satisfazer as necessidades do organismo em termos de carbono, nitrogênio, minerais, fatores de crescimento e água. É essencial ainda que o meio de cultivo não contenha materiais que inibam o crescimento celular. Outros fatores como o tipo do fermentador usado e o modo de operação (batelada ou contínuo) também influenciam o crescimento dos microrganismos (OKAFOR, 2007).

Dentre as biomoléculas produzidas por microrganismos de elevada aplicação industrial estão as enzimas, responsáveis pela catálise de diferentes reações bioquímicas que ocorrem nas células vivas. O uso de enzimas como catalisadores vem aumentando, uma vez que o consumo de produtos de origem ou síntese química está sendo reduzido de acordo com o maior desenvolvimento de tecnologias sustentáveis (ADSUL et al., 2020).

## 2.2 ENZIMAS

As enzimas são proteínas com alto grau de especificidade, também conhecidas como biocatalisadores que possuem excelentes propriedades, tais como, a elevada seletividade. Isto as permite a capacidade de atuação em uma grande variedade de processos químicos sob diversas condições reacionais (NELSON e COX, 2015).

Sua função metabólica é de grande influência em diversas interações bioquímicas, geralmente em ambientes muito complexos que requerem um elevado grau de especificidade,

como em reações altamente regioseletivas e estereosseletivas. A especificidade das enzimas baseia-se nas interações atrativas existentes entre a molécula do substrato e o sítio ativo da enzima e também com a conformação tridimensional entre as duas moléculas. Portanto, as enzimas são fundamentais para qualquer processo bioquímico, atuando na catálise de centenas de reações sucessivas sem serem degradadas, poupando assim gastos energéticos (OKAFOR, 2007).

Enzimas são cotidianamente utilizadas nas indústrias alimentícia, têxtil, de papel e na agricultura, pois resultam em significativas reduções de custos e processos mais rápidos. Apresentam uma faixa de “trabalho ótima”, na qual desempenham suas funções sem restrições, caso contrário, podem desnaturar-se e ficarem inativas. Dentre os fatores que afetam a atividade enzimática estão a temperatura, o pH e a concentração de substrato (NELSON e COX, 2015).

### 2.2.1 Fatores reguladores da atividade enzimática

As enzimas podem ter sua atividade influenciada por diversos fatores (NELSON e COX, 2015), como por exemplo:

1) **Temperatura:** Grande parte das enzimas aumentam as suas taxas de reações na medida em que a temperatura em que elas atuam eleva-se em 10°C. Algumas mantem sua atividade em elevadas temperaturas. Entretanto, essa taxa começa a decair a partir do momento em que a temperatura atinge os 40°C. A partir dessa temperatura, observa-se que as enzimas passam a sofrer desnaturação, que vem a ser um desdobramento de sua estrutura;

2) **pH:** Alterações no pH do meio em que a enzima se encontra leva a alterações em suas cargas. A manutenção da forma das enzimas deve-se à atração e repulsão entre as cargas dos aminoácidos que a constituem. Mudanças nessas cargas alteram a forma da enzima, afetam a ligação entre ela e substrato e, assim, a sua funcionalidade;

3) **Moléculas reguladoras:** Estas atuam regulando a taxa das vias metabólicas. Muitas vezes, elas ocupam o primeiro lugar da sequência da via metabólica e aumentam ou diminuem a atividade mediante alguns sinais, como os níveis de substrato ou a demanda energética da célula.

### 2.2.2 Classificação das enzimas

A *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) classificou as enzimas em seis grandes grupos (classes), de acordo com o tipo de reação que catalisam, dentre as quais, tem-se (NELSON e COX, 2015):

1. Oxido-redutases: são todas as enzimas que catalisam reações de oxidação-redução. O substrato oxidado é um hidrogênio ou doador de elétron. O nome mais comum dessas enzimas é desidrogenase;
2. Transferases: são enzimas que catalisam a transferência de grupos entre duas moléculas. Por exemplo, as metiltransferases transferem um grupo metila. O doador pode ser um cofator (coenzima) que carrega o grupo a ser transferido;
3. Hidrolases: catalisam reações de hidrólise (quebra de uma molécula em duas outras, na presença de água). Exemplos: amilase, urease, xilanase, pepsina, tripsina, quimotripsina e várias peptidases e esterases;
4. Liases: catalisam a adição de grupos às duplas ligações ou formação de duplas ligações por meio de remoção de grupos;
5. Isomerases: responsáveis pelas transferências de grupos dentro da mesma molécula para formar isômeros;
6. Ligases: realizam as reações de síntese, onde duas moléculas são unidas, às custas de uma ligação fosfato de alta energia do ATP.

Dentre os grupos de classificação das enzimas, as hidrolases destacam-se devido a sua aplicabilidade em diversos setores industriais, em especial: têxtil, alimentício, papel, couro, detergente (KIRK et al., 2002). Em 2019, as enzimas possuíam um mercado de aproximadamente US \$ 8,63 bilhões e existe uma projeção de que este valor chegue a US \$14,50 bilhões até 2027. Os grupos de enzimas mais importantes para o mercado são as proteases, lipases, polimerases e nucleases, sendo o grupo mais proeminente o das chamadas carboidrases, com importante papel na indústria farmacêutica e de alimentos (MANJREKAR; WADEKAR e SUMANT, 2021).

As hidrolases são responsáveis por hidrolisar ligações covalentes, utilizando água como receptor de grupos funcionais de outras moléculas. As vantagens encontradas no trabalho com essas enzimas microbianas são o baixo custo produtivo e a possibilidade de

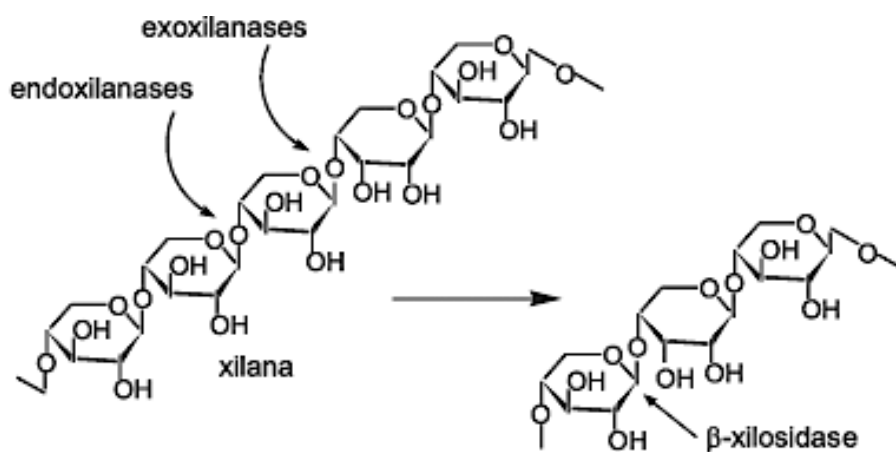
produção em larga escala por fermentadores industriais (OLIVEIRA et al., 2006). As xilanases são exemplos de enzimas hidrolíticas de ampla aplicação industrial.

### 2.3 XILANASES

As xilanases (EC 3. 2. 1. 8) são uma classe de enzimas principalmente produzidas por microrganismos e responsáveis pela decomposição das paredes celulares das plantas. Constituídas de endoxilanase (EC 3.2.1.8) e  $\beta$ -xilosidase (EC 3.2.1.3), têm como substratos naturais as hemiceluloses, que são polissacarídeos presentes em matérias primas lignocelulósicas. Por sua vez, as hemiceluloses compõem uma mistura de polissacarídeos não celulósicos, associados à celulose e encontrados geralmente no meio da lamela média das plantas, em toda a extensão da fibra (BAJPAI, 2014; GOMES, 2014).

A hemicelulose mais comumente presente na parede celular das plantas terrestres é a xilana, representando mais de 30% em peso seco. Assim, as xilanases são fundamentais para as reações de hidrólise da xilana (BAJPAI, 2014). A Figura 1 ilustra o processo de degradação da xilana através da atuação das enzimas xilanolíticas.

Figura 1 - Enzimas xilanolíticas envolvidas na degradação da xilana.



Fonte: GOMES et al. (2007).

As xilanases possuem alto potencial industrial em diferentes setores, principalmente na etapa de pré-branqueamento da polpa Kraft na indústria de papel e celulose. Além disso,

podem atuar na indústria de alimentos, na fabricação de pães, aumentando o volume e melhorando a textura da casca e miolo; na etapa de filtração da cerveja, auxiliando a ruptura dos sólidos em suspensão; na clarificação de sucos; na extração de café; óleos vegetais e de amido e podem ser adicionadas à ração para aves e suínos, facilitando a digestão dos nutrientes (KUMAR et al., 2017).

Muitas enzimas fúngicas apresentam efeitos em dietas com alimentos alternativos para frangos de crescimento lento. A alimentação representa maior parte do custo total de produção, para reduzir os gastos e aumentar o lucro do produtor têm sido pesquisados alimentos alternativos (como a torta de babaçu, torta de dendê e o bagaço de mandioca), que demonstram potencial de utilização na alimentação de frangos caipira, no entanto, com limitações de uso, devido aos diferentes teores de fibra. Os polissacarídeos não amiláceos dificultam o acesso das enzimas digestíveis sobre o alimento, diminuindo a digestibilidade dos nutrientes. Para minimizar esse efeito, têm sido suplementados enzimas exógenas nas dietas das aves. Várias fontes podem originar esses aditivos, sendo a maioria adquirida por meio dos processos fermentativos. A temperatura, o pH, a concentração do substrato e a composição dos ingredientes são fatores que influenciam a ação enzimática e, conseqüentemente, a disponibilidade dos nutrientes. Estudos demonstram que o uso das enzimas fúngicas podem aumentar o valor nutricional do alimento e melhorar a digestibilidade dos nutrientes, refletindo na eficiência produtiva, representando economia no custo de produção e benefícios ao meio ambiente (CAMPOS et al., 2017).

Quanto a aplicação das xilanases na indústria de óleos vegetais, apesar de ainda não ter sido encontrado nenhum trabalho que avalie o seu uso isoladamente no processo de produção de óleos, estas enzimas podem ser usadas em combinação, a exemplo de alguns estudos no qual foram utilizadas uma combinação de enzimas, incluindo celulasas, xilanases, pectinases, entre outras. A maioria dos estudos publicados estão voltados para a produção de azeites de oliva, mas as perspectivas apresentadas nesses trabalhos podem ser extrapoladas para outros tipos de óleos vegetais. Algumas empresas como a Takabio e a Novozymes fornecem xilanases, como a Sumizyme® (a partir de *Aspergillus niger* e *Trichoderma longibrachiatum* para melhoria da extração de óleos vegetais) e o Viscozyme® L (xilanases em conjunto com  $\beta$ -glucanases, pectinases e hemicelulasas para melhoria no rendimento durante a maceração das azeitonas) [Moura et al., 2021].

A grande variedade de xilanases existentes tem por consequência que essas enzimas fazem parte das famílias 10 e 11 das glicosil-hidrolases, sendo classificadas de acordo com seus domínios catalíticos, estrutura primária e similaridades nas cadeias de aminoácidos. Geralmente, as xilanases da família 10 são endo-1-4- $\beta$ -xilanases, e apresentam alto peso molecular (> 30 KDa) e baixo ponto isoelétrico. Enquanto as da família 11 são xilanases de alto ponto isoelétrico e baixo peso molecular (COLLINS; GERDAY e FELLER, 2005).

A produção dessas enzimas é comum a diversos microrganismos, sendo sintetizada por bactérias e fungos, mas também podem ser encontradas em plantas, algas marinhas, protozoários, gastrópodes e artrópodes. Contudo, os fungos filamentosos produtores de xilanase têm despertado grande interesse devido ao seu potencial de secretar a enzima em maiores quantidades se comparados a bactérias e leveduras (ZAMPIERI, 2011; 2015).

## 2.4 FUNGOS ENDOFÍTICOS E A PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

Devido a diversidade de microrganismos, a sua capacidade de adaptação, os fungos representam uma das mais importantes partes da biodiversidade terrestre. Apresentam mais de 1,5 milhões (HAWKSWORTH, 2001; AZEVEDO e BARATA, 2018) de espécies e constituem um vasto grupo de organismos extremamente diversificados encontrados em todos os nichos ecológicos, tais como, solo, água, vegetais, animais e detritos (ALEXOPOULOS e MIMS, 1996).

Já os fungos endofíticos são aqueles que vivem em tecidos vegetais sem causar dano ao hospedeiro. São uma rica fonte de produtos naturais novos e biologicamente ativos que colonizam um habitat ecológico relativamente inexplorado. Seu metabolismo secundário é particularmente ativo, presumivelmente devido às interações metabólicas com seus hospedeiros. Esse grupo de fungos pertencem, em sua maioria, ao filo Ascomycota e ao grupo dos fungos conidiais, existindo também, representantes dos filos Zigomycota, Chytridiomycota, Basidiomycota e Glomeromycota (SCHULZ et al., 1999).

Chapla, Biasetto e Araujo (2013), investigando novos compostos bioativos de fungos endofíticos associados à espécies da flora brasileira (*Alibertia macrophylla*, *Casaria sylvestris*, *Ocotea corymbosa*, *Cassia spectabilis*, *Piper aduncum*, *Cryptocaria mandioccana*, *Xylopiia aromatica* e *Palicourea marcgravii*), isolaram 42 produtos naturais e

suas estruturas foram estabelecidas com base em análise espectral abrangente, principalmente usando análises de ressonância magnética nuclear. Os compostos foram testados em suas atividades antifúngica, antioxidante, anticolinesterásica e anticâncer (CHAPLA; BIASETTO e ARAUJO, 2013).

Dentre as famílias de plantas existentes, a Myrtaceae apresenta cerca de 130 gêneros e aproximadamente 5.700 espécies (GOVAERTS et al. 2008) e é considerada como uma das famílias de maior riqueza de espécies nos neotrópicos (BARROSO et al., 1984). No Brasil, de acordo com Sobral et al. (2010), essa família tem 927 espécies distribuídas em 24 gêneros (FERREIRA e FORZZA, 2009), além de encontradas 214 espécies do gênero *Myrcia*, sendo os estados de Minas Gerais e Goiás considerados os principais centros de distribuição (BERG 1857-1859; LEGRAND e KLEIN, 1969).

Plantas do gênero *Myrcia* têm despertado o interesse de muitos pesquisadores, em particular devido à presença de considerável quantidade de compostos biologicamente ativos em seus metabólitos secundários, tais como flavonóides, sesquiterpenos, monoterpenos, triterpenos e os esteróides. Esses metabólitos podem ser encontrados nos óleos essenciais das folhas, flores e galhos da planta (CRUZ et al., 2002; KUSTER et al., 2003; CRUZ et al., 2004). Entre as plantas desse gênero, a espécie *M. guianensis*, conhecida popularmente na região norte do Brasil por pedraume-caá ou vassorinha, possui significativo potencial para dar origem a novas substâncias bioativas, sendo que o estudo com seus fungos endofíticos são ainda escassos (BANHOS et al., 2014).

O Grupo de Pesquisa Química aplicada à Tecnologia da EST/UEA vem realizando estudos relacionados à produção de hidrolases a partir de fungos endofíticos, incluindo xilanases. Esses fungos têm atraído bastante atenção por serem importantes produtores de enzimas extracelulares, e apresentam potencial de produzir substâncias sintetizadas por seu hospedeiro (MATIAS et al., 2021).

Em 2015, Silva isolou a partir de tecidos vegetais das espécies amazônicas *Piper hispidum* e *Myrcia guianensis* fungos endofíticos produtores de biossurfactantes, os quais foram extraídos do meio de cultivo e caracterizados quanto a suas propriedades físico-químicas. Dos quatro isolados considerados promissores na produção de moléculas tensoativas, três foram identificados por técnicas de biologia molecular como as espécies *Colletotrichum gloeosporioides*, *Aspergillus niger* e *Glomerella cingulata*, amplamente

reportadas como fitopatógenos e encontrados como endófitos, com grande potencial biotecnológico.

Matias et al. (2019; 2021), verificaram o potencial de produção de xilanases por 24 fungos endofíticos isolados de diversas partes da espécie amazônica *Myrcia guianensis*, observando que dois deles apresentaram maior potencial xilanolítico, produzindo a enzima em 48 h de cultivo. Os isolados selecionados foram identificados como sendo do gênero *Aspergillus* e ambos foram isolados da raiz da planta.

## 2.5 PROCESSOS DE RECUPERAÇÃO DE ENZIMAS

A investigação da produção de insumos biológicos passou a ter um grande impacto na área da biotecnologia devido à grande gama de aplicações, diversidade e biodegradabilidade dos produtos obtidos (SCHMIDELL et al., 2016). Contudo, os processos de obtenção e recuperação destes produtos biológicos envolvem muitas etapas, desde a obtenção até o isolamento, purificação e comercialização, sendo necessário garantir a pureza do produto final, de acordo com sua finalidade de uso (RATANAPONGLEKA, 2010).

O sucesso das indústrias biotecnológicas, a viabilidade da comercialização e da produção em escala industrial são diretamente dependentes das etapas de purificação e extração das biomoléculas desejadas, sendo geralmente as áreas de maiores custos e complexidade, ocupando entre 50-90% do custo total, variando de acordo com o grau de pureza requerido e a complexidade do processo (SCHMIDELL et al., 2016).

Observa-se ainda uma crescente necessidade de obtenção de biomoléculas de alta qualidade e com rendimentos cada vez maiores. Consequentemente, o desenvolvimento de novas técnicas de biosseparação e purificação têm sido alguns dos principais alvos das investigações científicas, cujo maior desafio é a manutenção do ambiente ideal do processo, o qual é bastante suscetível a alterações químicas e físicas ao longo do tempo, com o máximo de redução de custos possível (ORLANDELLI et al., 2012). Estes sistemas possuem moléculas complexas diluídas e misturas de multicomponentes que tendem a ser sensíveis a temperatura, pH, e a variação de concentração ao longo do processo e outras variáveis, podendo ser facilmente degradadas ou contaminadas, o que irá refletir na perda de

propriedades e até mesmo inviabilizando a utilidade dos compostos (MOHD-SETAPAR; HARU e MOHD-AZIZI, 2012).

Os métodos de purificação têm como fundamento a eliminação das impurezas presentes nas moléculas desejadas. Geralmente, o principal problema da recuperação de metabólitos por extração é a complexidade dos meios de cultura, o que significa que vários subprodutos também são extraídos junto ao produto desejado, somando os subprodutos metabólicos e outras impurezas. Impurezas encontradas nos bioprocessos incluem contaminantes derivados do meio de cultura, das células hospedeiras ou de impurezas, como vírus e fungos, por exemplo (AMID et al., 2015).

Existem diversas técnicas de separação as quais incluem precipitação (ZHANG; WANG e PENG, 2013), filtração por afinidade, sistema de micela reversa (MOHD-SETAPAR; HARU e MOHD-AZIZI, 2012), membranas com emulsão líquida cromatografia por afinidade, entre outros. A cromatografia e a extração líquido-líquido são, normalmente, as técnicas mais usuais na separação de produtos de origem biológica. A cromatografia, apesar de ser efetiva na separação, apresenta várias desvantagens ao longo do processo (AMID et al., 2015) e, para ser utilizada na produção em larga escala. A extração líquido-líquido, por outro lado, mostra-se como uma alternativa interessante para a recuperação de biomoléculas, uma vez que apresenta alta seletividade, biocompatibilidade e bons rendimentos (RATANAPONGLEKA, 2010).

## 2.6 MÉTODO DE EXTRACAO LÍQUIDO-LÍQUIDO (ELL)

A extração líquido-líquido destaca-se na recuperação e/ou purificação de biomoléculas devido à sua eficiência, versatilidade, baixo custo e facilidade de ampliação em escala. A operação tem como princípio a utilização de sistemas compostos de água/solventes orgânicos para extração de diversas substâncias com base nos conceitos de solubilidade e transferência de massa (SOUZA et al., 2015).

Dentre as diversas formas de extração líquido-líquido, destacam-se as extrações por sistemas micelares de duas fases aquosas, e sistemas poliméricos de duas fases aquosas. Ambas as técnicas têm sido usadas com êxito na purificação de biomoléculas, dentre as quais

a glicose-6-fosfato desidrogenase, a hexoquinase, o xilitol, a albumina do soro bovino (BSA), entre outras (BARROS, 2014).

A extração líquido-líquido pelo sistema de micelas reversas (SMR) tem como base as propriedades de auto-organização dos surfactantes quando em solução, na forma de micelas, a fim de adquirir a conformação mais estável. Essa operação unitária tem apresentado bons resultados na recuperação de compostos biológicos, pois a utilização de solventes orgânicos não interfere na atividade das moléculas de interesse (RATANAPONGLEKA, 2010).

O método de extração por micela reversa envolve um procedimento simples, composto de duas etapas. A primeira se refere à capacidade da micela reversa solubilizar as moléculas presentes em uma fase aquosa inicial para o interior do agregado micelar. Em seguida, a molécula solubilizada é re-extraída para outra fase aquosa (uma solução tampão, de pH e força iônica conhecidos). Ocorre então o contato das micelas com este novo meio aquoso que favorecerá a transferência de massa das moléculas englobadas em razão das alterações nas interações existentes no novo sistema (GONZÁLEZ e RUIZ, 2017).

A formação das micelas reversas somente é possível se o solvente e a água forem imiscíveis. Assim, os solventes mais comuns são hidrocarbonetos alifáticos, como o isooctano, o n-octano, o n-heptano e o ciclohexano, sendo possível também a utilização de outros solventes orgânicos como a acetonitrila (TONOVA e LAZAROVA, 2008).

Comumente utilizam-se co-solventes como auxiliares em sistemas de micelas reversas de tensoativos catiônicos, pois as micelas formadas por estas substâncias são muito pequenas e o encapsulamento das biomoléculas se torna ineficiente. O co-solvente pode ser um álcool de cadeia média, como hexanol ou n-butanol, que atuará de modo similar a uma solução tampão, provocando uma forte repulsão entre as interações íon-íon dos núcleos do tensoativo, permitindo a formação do núcleo interno da micela reversa (PIRES; AIRES-BARROS e CABRAL, 1996; TONOVA e LAZAROVA, 2008). Os agentes tensoativos mais comumente utilizados em SMR estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Agentes tensoativos utilizados na extração líquido-líquido de proteínas e o respectivo rendimento de extração.

<b>Tipo</b>	<b>Agente tensoativo</b>	<b>Proteína recuperada</b>	<b>Referência</b>	<b>% Extração</b>
CATIÔNICO	CTAB – Cloreto de benzil dodecil bis (hidroxietil) amônio/Brometo de cetiltrimetil amônio	3-Xilosidase	Hasmann, 2000	43
	BDBAC – Cloreto de trioctilmetil amônio /Brometo de dodeciltrimetil amônio	Xilanase	Rodrigues, 1997	73
ANIÔNICO	AOT – bis (etilhexil) sulfosuccinato de sódio/ Di-octil sulfossuccinato de sódio	Lectina BSA	Nascimento, 2006 Pawar; Regupathi e Prasanna, 2017	77 95

Fonte: KILIKIAN et al. (2000).

De acordo com a literatura, o surfactante aniônico AOT (bis (2-etilhexil) sulfosuccinato de sódio) tem sido amplamente utilizado e mostra-se adequado para a separação de proteínas de elevado ponto isoelétrico (pI). Para as proteínas de baixo ponto isoelétrico, são recomendados agentes tensoativos catiônicos como o cloreto de trioctilmetil amônio - BDBAC (SINTRA; VENTURA e COUTINHO, 2014).

A proporção entre os componentes tensoativos, solvente e água influencia diretamente na formação das micelas reversas. Portanto, podem-se utilizar diagramas de fases específicos para cada sistema, também conhecidos como diagramas ternários (RODRIGUES, 2001).

O pH da solução afeta as características de solubilização da proteína, pois a carga líquida da proteína sofre alterações na sua distribuição de cargas superficiais. Com isso, as interações eletrostáticas entre os componentes micelares e as biomoléculas são modificadas. A solubilização da proteína na fase micelar geralmente necessita de cargas opostas entre o tensoativo e a proteína. Esta tendência tem sido observada para peroxidase, lipase, xilanase,

(3-xilosidase) e  $\beta$ -glicosidase ( $\beta$ -D-glicosídeo glicohidrolase, EC 3.2.1.21) usando tensoativos aniônicos (PATEL; NAGARAJAN e KILARA, 1996).

Contudo, para a etapa de re-extração, o valor do pH deve ser escolhido de tal modo que a proteína tenha a mesma carga da molécula do tensoativo. Assim, haverá uma força de repulsão que ocasionará a liberação das proteínas englobadas (RATANAPONGLEKA, 2010).

Outro fator que merece atenção é a força iônica da fase aquosa. Esta não deve ser elevada o suficiente a ponto de prejudicar a eletroneutralidade necessária para que ocorram as interações eletrostáticas entre a proteína e o tensoativo. Assim, para que se obtenha as condições mais favoráveis possíveis para a extração de proteínas por micelas reversas, deve-se usar baixa força iônica e  $\text{pH} > \text{Ponto isoeletrico (pI)}$  para tensoativos catiônicos. No entanto, para a etapa de re-extração, a situação se inverte, uma vez que se deseja que a proteína seja "expulsa" da micela. Portanto usa-se: alta força iônica e  $\text{pH} > \text{pI}$  para tensoativos aniônicos e  $\text{pH} < \text{pI}$  para tensoativos catiônicos (ANDREWS; PYLE e ASENJO, 1994).

O parâmetro  $W_o$  representa a quantidade de água nas micelas reversas ("*water in oil*"), e pode ser obtido pela Equação 1 que exprime a relação entre a concentração molar de água e de tensoativo (LUISI et al., 1988).

$$W_o = [H_2O] / [\text{tensoativo}] \quad (1)$$

Este é um parâmetro de suma importância no sistema, pois determina a estrutura e o tamanho das micelas reversas e o número de moléculas de tensoativo por micela reversa (AIRES-BARROS, 1991). O tamanho das micelas reversas pode ser determinado também através de métodos experimentais como ressonância magnética e técnicas de dispersão de luz (SEOUD et al., 1999).

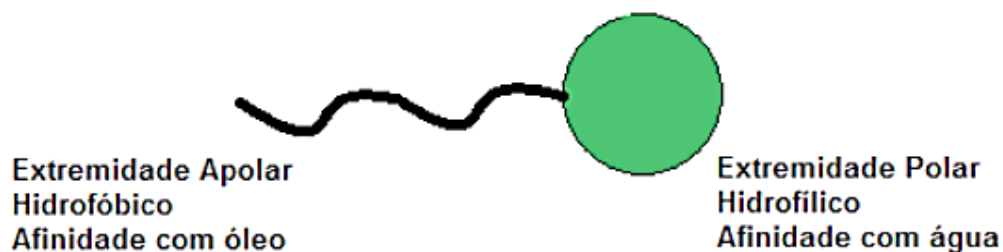
A temperatura também é um fator de importância na absorção de proteínas pela micela, pois dela depende a capacidade máxima de absorção da micela. Dentro de uma determinada faixa de temperatura, as micelas reversas são formações estáveis, o que favorece a absorção de moléculas. De acordo com Luisi et al. (1988), a presença de enzimas no interior da micela a temperaturas mais elevadas vai depender mais da sua termoestabilidade do que da capacidade de absorção da micela. Em temperaturas inferiores à faixa ótima, as micelas

encolhem e perdem sua capacidade de absorção. Temperaturas elevadas afetam o coeficiente de partição do agente tensoativo, de modo que, praticamente, este não permaneça mais na fase orgânica e só seja encontrado na fase polar (KREI e HUSTEDT, 1989).

## 2.7 TENSOATIVOS

O termo surfactante tem origem da expressão em inglês “surface active agent”, que se traduzida literalmente, significa “agente de atividade superficial”, que é um reflexo das propriedades destes compostos. Também conhecidos como tensoativos, os surfactantes são moléculas anfipáticas, ou seja, moléculas compostas por duas regiões com polaridades distintas, uma parte polar ou hidrofílica e uma cadeia carbônica apolar ou hidrofóbica. Um surfactante típico possui a estrutura R-X, onde R é uma cadeia de hidrocarboneto variando de 8 a 18 átomos (normalmente linear) e X é o grupo polar (ou iônico). A Figura 2 ilustra o caráter anfipático dos tensoativos (MOHD-SETAPA; HARU e MOHD-AZIZI, 2012).

Figura 2 - Esquema representativo da estrutura de um tensoativo.



Fonte: CRUZ (2013).

Devido a sua grande aplicação em diferentes indústrias, a produção mundial de surfactantes excede 3 milhões de toneladas/ano, com sua utilização se concentrando nas indústrias de petróleo, de cosméticos, de produtos de higiene e de limpeza (BANAT, 2000), onde este último é o setor que utiliza a maior parte dos surfactantes produzidos como matéria-prima para fabricação de detergentes de uso doméstico (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Apesar dos desafios técnicos, a estimativa é que o mercado de biosurfactantes, surfactantes produzidos por microrganismos, apresente um faturamento de cerca de US\$ 2,7

bilhões de dólares e um volume de comercialização de aproximadamente 524 mil toneladas de surfactantes em 2023. As empresas líderes na produção desses compostos são a Ecover (Bélgica), a Urumqui Unite (China), a BASF-Cognis (Alemanhã), a Saraya (Japão) e a MG Intobio (Coreia do Sul) [FELIPE e DIAS, 2016]. Estes compostos são uma alternativa ambientalmente correta aos surfactantes sintéticos, embora ainda possuam custo superior.

Os surfactantes apresentam as seguintes características (SCHWEITZER, 2003):

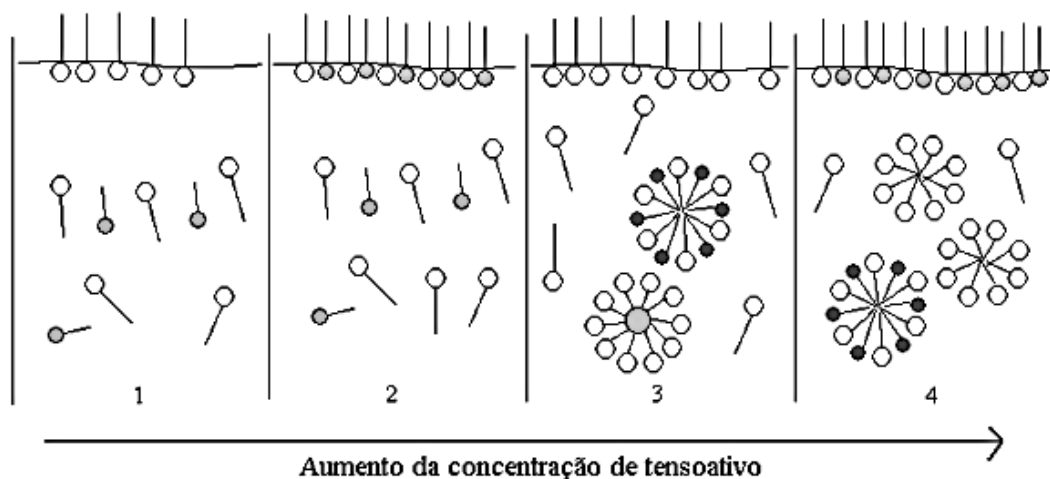
- I. Quando em solução, diminuem a tensão interfacial, devido à adsorção e orientação na interface;
- II. Existência de moléculas dispersas em solução;
- III. Formação de micelas acima da Concentração Micelar Crítica (CMC) devido ao decréscimo de energia livre do sistema;
- IV. Solubilização de substâncias insolúveis em água pelas micelas. As mais utilizadas nas indústrias de alimentos são principalmente os surfactantes não-iônicos (monoacilgliceróis, éster de sacarose de ácidos graxos), aniônicos (ácidos graxos), ou zwitteriônicos (lecitina) que apresentam as propriedades combinadas de surfactantes iônicos e não-iônicos.

Os surfactantes podem promover a solubilização e a emulsificação de materiais insolúveis e podem reduzir a tensão superficial da solução para facilitar o processamento, dependendo da polaridade do sistema. Isto evidencia uma importante propriedade dos surfactantes, que é a formação de um filme molecular, ordenado nas interfaces, que reduz a tensão interfacial e superficial (ROSSI, 2006). Este é um importante aspecto do seu uso, que inclui aplicações industriais em decorrência de propriedades como: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, molhabilidade, solubilização e dispersão de fases. O papel comum do surfactante em todas estas aplicações é a de modificar a característica da interface (DALVIN, 2012).

Os tensoativos possuem muitas propriedades únicas, dentre as quais está a propriedade de se adsorverem nas interfaces (limite entre duas fases imiscíveis) ou superfícies de um dado sistema. De modo geral, não há grande variação significativa nas físico-químicas de tensoativos, mesmo em baixas concentrações. Contudo, para uma dada concentração específica de tensoativo, conhecida como Concentração Micelar Crítica (CMC), ocorre uma mudança nestas propriedades (ROSSI, 2006; KILIKIAN et al., 2000).

Para concentrações abaixo da CMC, as moléculas de tensoativo estão predominantemente na forma de monômeros dispersos, e acima, estão presentes na forma de agregados coloidais termodinamicamente estáveis, denominadas micelas, conforme pode ser observado na Figura 3. Este processo de formação é conhecido como micelização e está relacionado com a estrutura do tensoativo (tamanho da cadeia do hidrocarboneto) e das condições ambientais (força iônica, contra-íons, temperatura, etc.). A formação das micelas pode causar variações de diversas propriedades físico-químicas como detergência, tensão superficial, tensão interfacial, condutividade iônica e pressão osmótica (DALTIM, 2012).

Figura 3 - Representação esquemática da formação de micelas com o aumento da concentração de tensoativo.



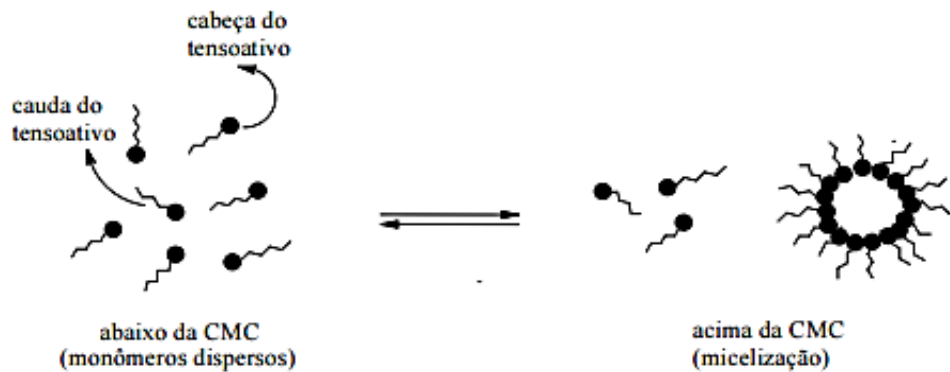
Fonte: ROSSI (2006).

Em soluções diluídas, as moléculas tensoativas se comportam como eletrólitos típicos em uma estrutura monomérica, de modo que sua orientação é predominantemente nas interfaces, pois esta conformação é aquela com menor repulsão e conseqüentemente há uma redução na tensão interfacial. Os grupos polares são atraídos pela água devido às forças eletrostáticas semelhantes, enquanto a porção hidrofóbica é repelida pela fase aquosa (WANDERLEY NETO, 2009).

Ao se adicionar tensoativo em água, parte do composto é solubilizado como monômero e parte forma uma espécie de película na interface ar-água, de modo que as moléculas presentes na superfície permanecem em equilíbrio com os monômeros que se

formam na solução, havendo uma tensão superficial característica para cada concentração do tensoativo. Quando essa concentração alcança um valor crítico, representado pela saturação na interface, desencadeia-se o processo de formação espontânea de agregados moleculares ou micelas conforme a Figura 4 (ROSSI, 2006).

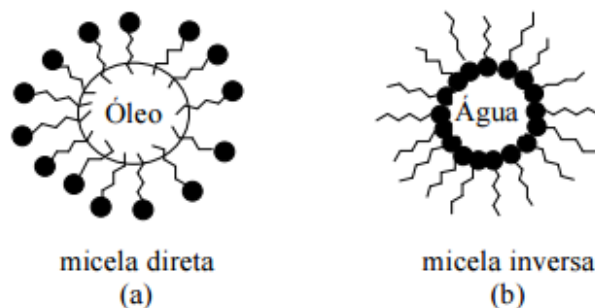
Figura 4 - Formação de micelas.



Fonte: ROSSI (2006).

Caso o meio em que a molécula de tensoativo estiver possua caráter iônico, a parte hidrofóbica da molécula irá se agrupar no interior da micela, de modo a minimizar o contato das superfícies com a água, enquanto as extremidades polares ficam dirigidas para o meio aquoso, onde são miscíveis, formando assim uma micela direta. Caso contrário, ocorre o inverso, e a orientação das moléculas é a seguinte: cabeças polares no centro e cadeias carbônicas voltadas para o meio, formando as micelas inversas ou reversas (SILVERMAN KALOTA e STOVER, 1995), conforme apresentado na Figura 5.

Figura 5 - Micelas direta (a) e inversa (b).



Fonte: ROSSI (2006).

### 2.7.1 Classificação dos Tensoativos

Tensoativos podem ser classificados em iônico (aniônico e catiônico), não-iônico ou zwitteriônico (anfótero), de acordo com a sua estrutura química. Tensoativos iônicos apresentam cargas elétricas na parte hidrofílica quando dissociados em água, podendo formar íons carregados negativamente (tensoativos aniônicos) ou positivamente (tensoativos catiônicos). Os tensoativos aniônicos mais conhecidos são os alquil alcanoatos, os detergentes, que possuem cadeias variantes entre 12 e 18 carbonos, derivados de gorduras animais, ou óleos vegetais, por reações de saponificação. Dentre os tensoativos catiônicos, destacam-se sais de amônio quaternários (solúveis tanto em meio ácido como em meio alcalino, proporcionando aumento de viscosidade e ação bactericida) e aminas de cadeias longas (utilizadas como óleos lubrificantes, como inibidores de corrosão em superfícies metálicas e como coletores de flotação na indústria de minérios) [DALTIM, 2012].

Tensoativos não-iônicos são aqueles que não se ionizam em solução aquosa. Sua solubilidade em água se deve à presença de grupamentos funcionais que possuem forte afinidade pela água. Como exemplos destacam-se o nonilfenol etoxilado, álcoois graxos etoxilados e o propilenoglicoletoxilado (DALTIM, 2012).

Tensoativos zwitteriônicos são aqueles que em condições normais, apresentam tanto carga aniônica quanto catiônica e são citados como tensoativos anfóteros, apesar deste termo não ser o mais adequado, pois um tensoativo anfótero é aquele que, dependendo do pH, pode ser aniônico (pH entre 9 e 10) ou catiônico (pH de 4 a 9), ou zwitteriônico. Portanto, pode-se dizer que os tensoativos zwitteriônicos são compostos que possuem tanto o caráter ácido quanto o básico. No ponto isoelétrico, (pI), onde de acordo com o pH da solução, a molécula possui carga elétrica igual a zero, esses tensoativos apresentam-se como espécies zwitteriônicas, mostrando um mínimo de solubilidade, detergência e capacidade molhante (DALTIM, 2012).

Dessa forma, verifica-se que devido às suas características químicas, o uso de tensoativos na extração líquido-líquido em SMR para a recuperação de biomoléculas pode representar uma alternativa interessante para a extração de enzimas do meio de cultivo microbiano.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O fluxograma com a sequência de etapas da realização deste estudo pode ser observado na Figura 6.

Figura 6 – Fluxograma das etapas metodológicas utilizadas no presente trabalho.

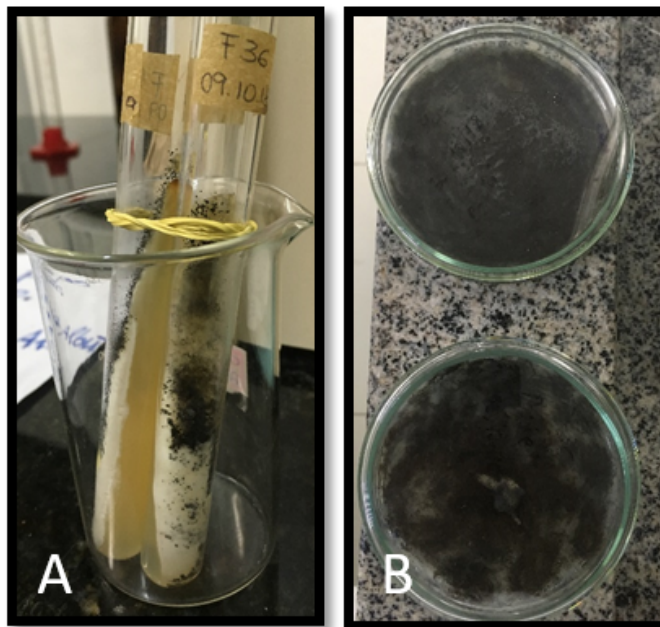


Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

#### 3.1 MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado no presente trabalho foi o fungo endofítico *Aspergillus* sp. F36 (Figura 7), isolado de *Myrcia guianensis* (Myrtaceae), que foi previamente selecionado como um bom produtor de xilanase (MATIAS, 2018). O fungo *Aspergillus* sp. F36 faz parte da Central de Coleções Microbiológicas (CCM) da Universidade do Estado do Amazonas (UEA). O mesmo foi reativado e mantido em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose (SDA), sendo armazenado em incubadora do tipo BOD, a 28°C por 5 dias.

Figura 7 - Fungo endofítico *Aspergillus* sp. F36, isolado de *Myrcia guianensis* (Myrtaceae) cultivado em meio ágar Sabouraud dextrose. A) Tubo de ensaio. B) Placa de Petri.



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

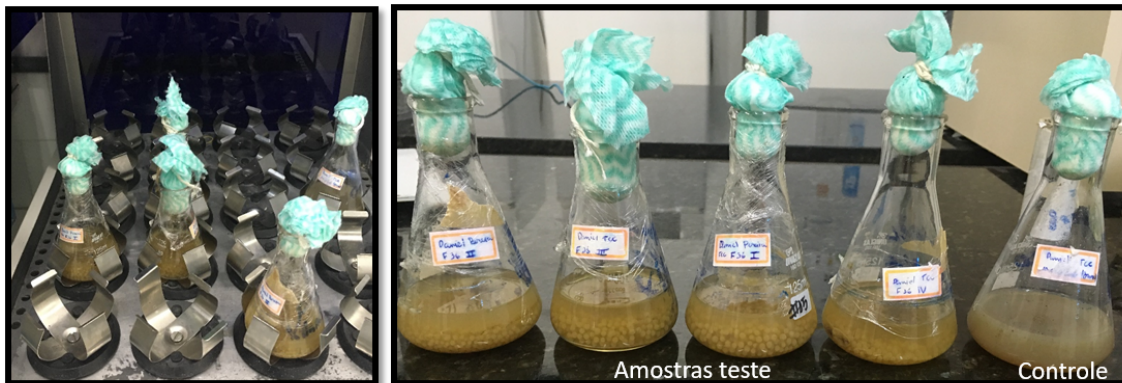
### 3.2 PRODUÇÃO DE XILANASE

O fungo foi cultivado em meio líquido, conforme a metodologia de Sousa-Gomes (2014), sendo os experimentos realizados em triplicata e acompanhados de um controle negativo contendo apenas meio de cultivo, incubado sob as mesmas condições experimentais. Os experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultivo, compostos dos nutrientes  $\text{NaNO}_3$  (1,0 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,5 g/L),  $\text{MgSO}_4$  (0,5 g/L),  $\text{CuSO}_4$  (0,25 g/L),  $\text{MnCl}_2$  (0,0116 g/L),  $\text{H}_3\text{BO}_4$  (0,00949 g/L),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,00235 g/L),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,136 g/L),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,0088 g/L), extrato de levedura (2,0 g/L) e 1% de xilana. Posteriormente, fez-se o inóculo de 1% de uma solução de esporos ( $10^6$  esporos/mL), previamente padronizada em uma câmara de Neubauer.

O cultivo foi mantido em incubadora do tipo *shaker* sob agitação de 150 rpm e temperatura de  $28^\circ\text{C}$  por 48 horas (Figura 8). Após a fermentação, filtrou-se a mistura com bomba à vácuo, seguido de centrifugação a 15.000 rpm por 10 min para remoção das células

fúngicas. As soluções enzimáticas foram armazenadas a 4°C e utilizadas para a dosagem da atividade enzimática e para a etapa de extração líquido-líquido.

Figura 8 - Cultivo do fungo *Aspergillus* sp. F36 em meio líquido em shaker, a 28°C durante 48 horas.



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

### 3.3 EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO PARA SEPARAÇÃO DA XILANASE

A enzima foi extraída do meio de cultivo pelo sistema de micelas reversas, seguindo a metodologia de Rodrigues (2001). O processo foi conduzido em duas etapas. O pH da fase aquosa foi definido pelo tampão fosfato (de pH 7,0) utilizado na solubilização da amostra (caldo fermentado após filtragem).

Na primeira etapa, denominada extração, a solução aquosa contendo a enzima foi misturada à microemulsão em partes iguais. Após agitação em vórtex por 3 min, a mistura foi centrifugada por 10 min para separação das fases. Para a segunda etapa, o sobrenadante foi retirado e utilizado nos ensaios de re-extração. Tal etapa foi realizada misturando-se 2,0 mL da pseudofase micelar com 2,0 mL de tampão acetato de sódio 1,0 M pH 5,5 adicionado de NaCl (de modo a se obter solução final 1,0 M), com a finalidade de transferir (re-extrair) a enzima da micela para a nova fase aquosa. A amostra foi novamente agitada e centrifugada nas condições anteriormente citadas. Os resultados da extração foram expressos em termos da atividade total recuperada (%) da enzima, tendo como referencial a quantidade de proteínas do precipitado solubilizado no valor de pH estudado.

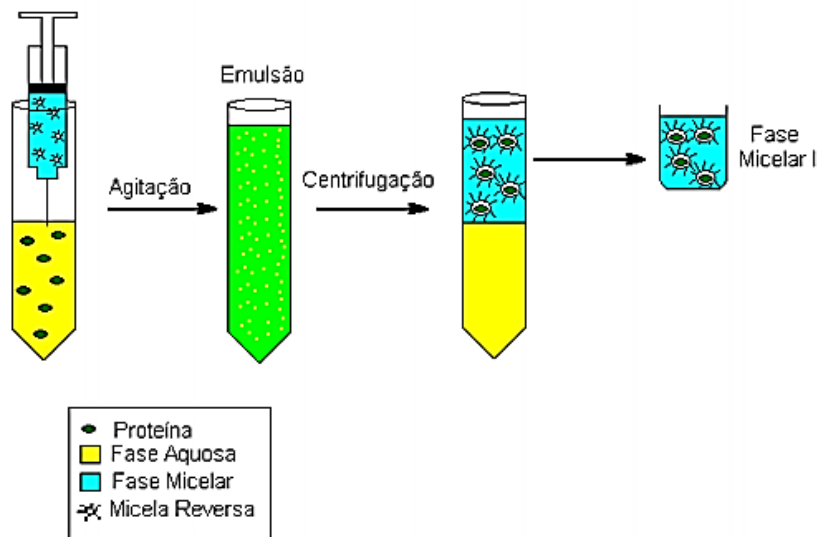
As soluções micelares foram preparadas com o tensoativo catiônico brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB). Como solvente foi utilizado o isoctano. Como co-solvente foi utilizado o butanol (CORTEZ et al., 2002). As soluções contendo tensoativo, solvente e co-solvente foram preparadas de acordo com a matriz do planejamento experimental, sendo o volume de tensoativo no solvente e no co-solvente, utilizado na proporção de 92,5 para 7,5%, respectivamente. Para a análise de pH e de força iônica, utilizou-se pHmetro (Nova Técnica S.A) e condutivímetro (Gehaka S.A).

O processo de extração da xilanase foi realizado na seguinte sequência de operação, conforme demonstrado na Figura 9:

- 1) 5 mL da solução de xilanase foi misturada com igual volume da solução micelar em tubo de ensaio;
- 2) A solução foi agitada em vórtex por 3 minutos até o aparecimento de emulsão;
- 3) O tubo foi centrifugado a 2.300 rpm por 10 minutos para a separação das fases;
- 4) A fase micelar (superior) foi retirada para utilização na etapa de re-extração;

Os diferentes valores de pH utilizados foram determinados de acordo com a faixa de pH que mantivesse a atividade proteolítica da xilanase e que também favorecesse a extração e re-extração, conforme a operação usada.

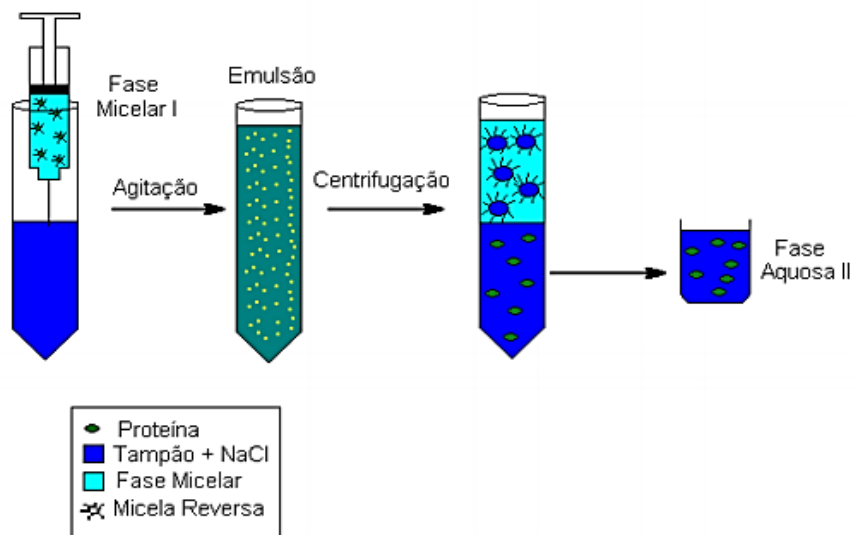
Figura 9 - Representação da etapa de extração da xilanase por micelas reversas.



Fonte: BORRACINI (2006).

Para a re-extração, foi feita uma mistura de 2,0 mL da solução micelar obtida, contendo a enzima, e 2,0 mL de uma nova fase aquosa (tampão acetato de sódio pH 5,5 e 1,0 M, adicionado de NaCl 0,5 M). Em seguida a mistura foi agitada e centrifugada conforme a etapa de extração, exemplificada na Figura 10.

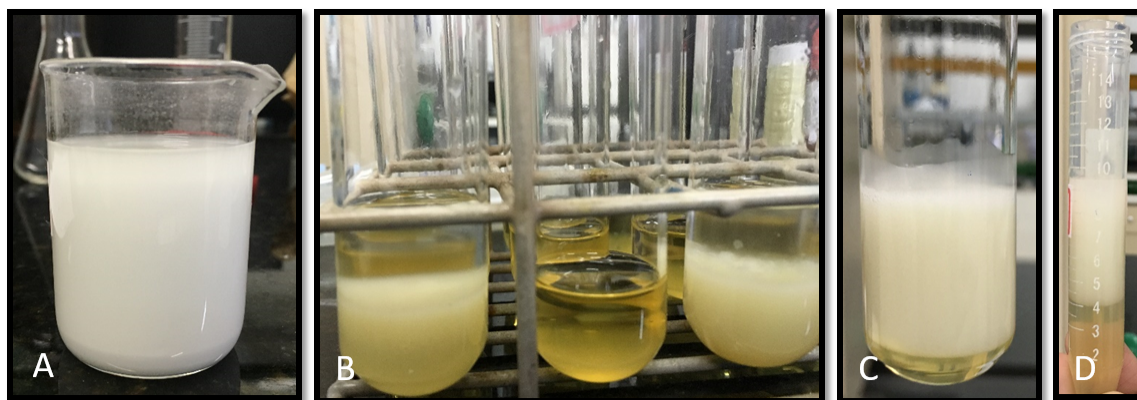
Figura 10 - Representação da etapa de re-extração da xilanase por micelas reversas.



Fonte: BORRACINI (2006).

A fase aquosa foi analisada, determinando-se a proteína total e atividade enzimática. A Figura 11 apresenta as etapas envolvidas na extração líquido-líquido da xilanase.

Figura 11 - Extração líquido-líquido para separação da xilanase. A) solução de CTAB; B) Extração antes de agitação; C) Extração após agitação em vortex; D) Re-extração.



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

### 3.4 ESTUDO DOS PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM A EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO (ELL)

Foram avaliadas as concentrações do tensoativo CTAB (M) e da força iônica (mS/cm), através da adição de cloreto de sódio (NaCl), utilizados na extração líquido-líquido. Foi realizado um planejamento experimental do tipo DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) para definir a concentração de CTAB e a força iônica que favorecem a extração e, conseqüentemente, garantem a maior atividade de xilanase (RODRIGUES, 2001). As variáveis avaliadas e seus níveis estão apresentadas na Tabela 2. A matriz do DCCR está apresentada na Tabela 3. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Tabela 2 – Níveis das variáveis avaliadas no Delineamento Composto Central Rotacional.

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Tensoativo (M)	0,282	0,200	0,300	0,400	0,564
Força iônica (mS/cm)	19,035	10,500	12,000	13,500	19,035

Tabela 3 - Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional para o estudo das condições de recuperação de xilanase fúngica por micelas reversas de CTAB.

Ensaio	Níveis codificados		Níveis decodificados	
	Tensoativo	Força iônica	Tensoativo (M)	Força iônica (mS/cm)
1	-1	-1	0,200	10,500
2	1	-1	0,400	10,500
3	-1	1	0,200	13,500
4	1	1	0,400	13,500
5	-1,41	0	0,282	12,000
6	1,41	0	0,564	12,000
7	0	-1,41	0,300	14,800
8	0	1,41	0,300	19,035
9	0	0	0,300	12,000
10	0	0	0,300	12,000
11	0	0	0,300	12,000

### 3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE XILANASE

O cálculo da atividade enzimática foi realizado a partir da determinação dos açúcares redutores liberados na reação de hidrólise da xilana, conforme a metodologia descrita por Miller (1959). A partir da leitura das absorbâncias em espectrofotômetro UV-Vis em comprimento de onda de 540 nm foi construída a curva padrão, cujos cálculos de regressão linear foram obtidos com o auxílio do Software *Origin 8.0*. A partir da obtenção da equação da reta padrão e consequentemente do coeficiente angular, foi obtido o valor da absorvidade ( $\epsilon$ ) para o comprimento de onda utilizado (Equação 2) para o açúcar redutor (xilose).

$$\epsilon = a * MM \quad (2)$$

Onde:

$\epsilon$  = absorvidade a 540 nm

a = coeficiente angular da curva padrão

M.M. = massa molecular da xilose

A partir do cálculo da absorvidade, verificou-se o quanto de xilose reage com o DNS (Figura 12), determinando assim a quantidade de açúcares redutores presentes na amostra. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como aquela correspondente à liberação de um  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor equivalente a xilose por minuto, por mL da amostra, nas condições do ensaio. Para o cálculo da atividade enzimática (U/mL), foi usada a Equação 3.

$$U = Abs * \frac{1}{t} * 1000 * \frac{1}{\epsilon} * \frac{1}{V_a} * V_f \quad (3)$$

Onde:

Abs = absorbância da amostra a 540 nm

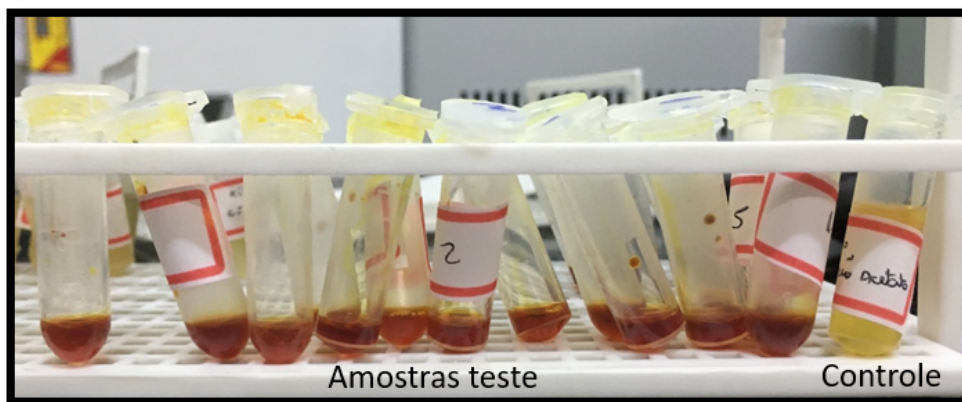
t = tempo de reação em minutos

$\epsilon$  = absorvidade

Va = volume da amostra em mL

Vf = volume final da reação em mL

Figura 12 - Ensaio de atividade enzimática.

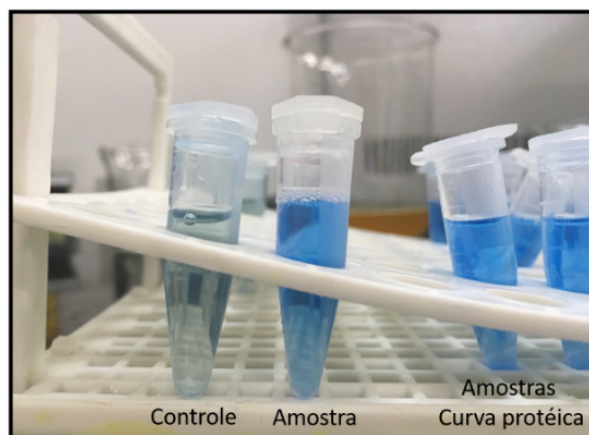


Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

### 3.6 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

Foi utilizado o método de Bradford (1976), uma técnica colorimétrica para a determinação de proteínas totais, utilizando o corante “Coomassie brilliant blue” BG-250, que possui faixa de detecção entre 20 e 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Este método baseia-se na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. Em condições ácidas, a forma vermelha do corante é convertida em sua forma azul (Figura 13), ligando-se à proteína que está sendo testada. Se não houver proteína para se ligar, a solução permanecerá marrom.

Figura 13 - Dosagem de proteínas pelo método de Bradford.



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Para a curva padrão foi preparado 200  $\mu\text{L}$  de uma solução de BSA (*Bovine Serum albumin* / albumina do soro bovino) a 1,0 mg/mL e, a partir dessa solução foram feitas diluições seriadas em água Milli-Q para as demais concentrações com o objetivo de se construir uma curva de calibração. Em seguida, a cada 10  $\mu\text{L}$  da solução diluída era acrescido o volume de 790  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q e 200  $\mu\text{L}$  do reagente de Bradford. Fez-se a preparação do Branco (800  $\mu\text{L}$  água Milli-Q e 200  $\mu\text{L}$  de reagente) e para a dosagem de proteína total das amostras foi feita a adição de 10  $\mu\text{L}$  das amostras a 790  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q e 200  $\mu\text{L}$  do reagente. As reações foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos, sendo em seguida realizadas as leituras de absorvância (Abs) em espectrofotômetro a 595 nm.

A partir da quantificação da concentração de proteínas, determinou-se a atividade enzimática específica dos extratos enzimáticos (U/mg de proteínas).

### 3.7 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO

O rendimento expresso em proteínas totais (np) foi calculado pela Equação 4, sendo que as massas P2 e P1 correspondem à concentração de proteína multiplicada pelo volume da fase considerada.

$$np = (P2/P1) \quad (4)$$

Onde:

P2 = proteínas totais da fase extraída (mg);

P1 = proteínas totais antes da purificação (mg).

O % de rendimento expresso em atividade ou Recuperação (Y) foi calculado pela Equação 5, sendo que as atividades A1 e A2 correspondem à atividade enzimática multiplicada pelo volume da fase considerada.

$$Y = 100*(A2/A1) \quad (5)$$

Onde:

A2 = atividade na fase extraída (U);

A1 = atividade da amostra antes da purificação (U).

### 3.8 DETERMINAÇÃO DO FATOR DE PURIFICAÇÃO

Para o cálculo do fator de purificação (FP) utilizou-se a Equação 6:

$$FP = \frac{A_2/P_2}{A_1/P_1} \quad (6)$$

Onde:

A1 = é a medida da Atividade enzimática (U/mL) da amostra ensaiada

A2 = Atividade enzimática da solução de extração reversa

P1 = concentração total de Proteínas (mg/mL) da amostra controle (caldo fermentado)

P2 = concentração de Proteínas totais da solução de extração reversa (caldo fermentado)

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o Software TIBCO STATISTICA™ v. 14.0 para a análise estatística a partir do planejamento experimental ( $p < 0,05$ ).

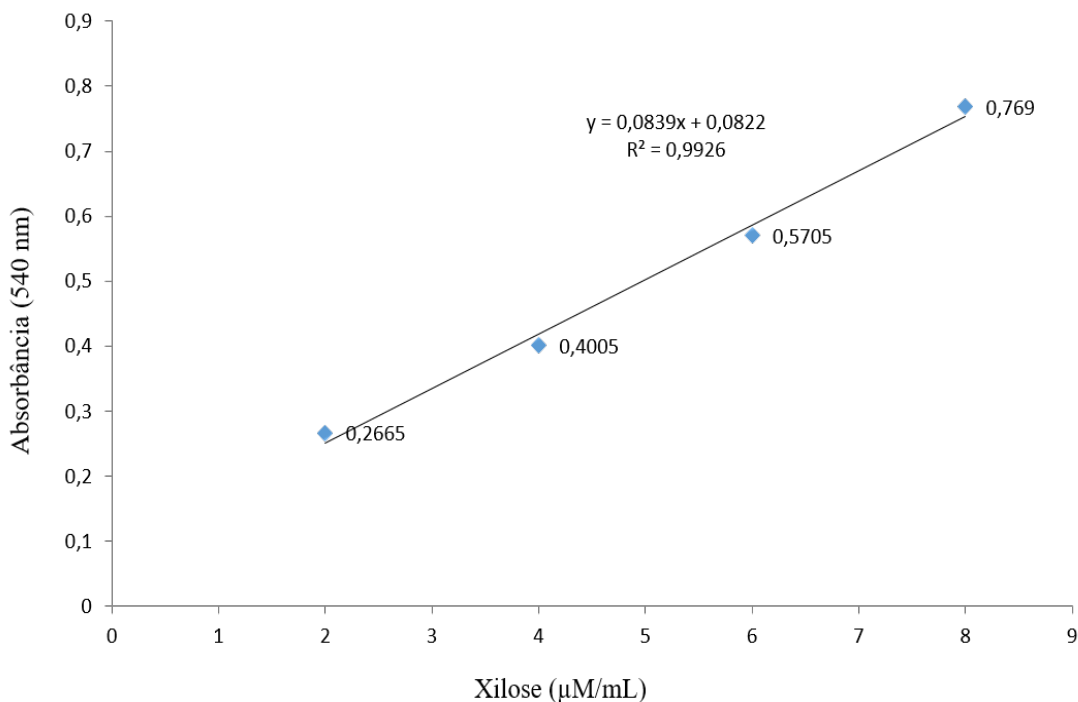
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização de enzimas isoladas da biodiversidade advinda da microbiota amazônica em processos industriais é uma alternativa interessante para sanar problemas ambientais, além de envolver baixos custos no processo, uma vez que esse seja otimizado. Deste modo, o presente trabalho teve como meta principal avaliar a produção da xilanase fúngica e a recuperação enzimática através de uma extração líquido-líquido em sistema micelar reverso, variando a concentração de tensoativo e a força iônica.

### 4.1 CURVAS ANALÍTICAS

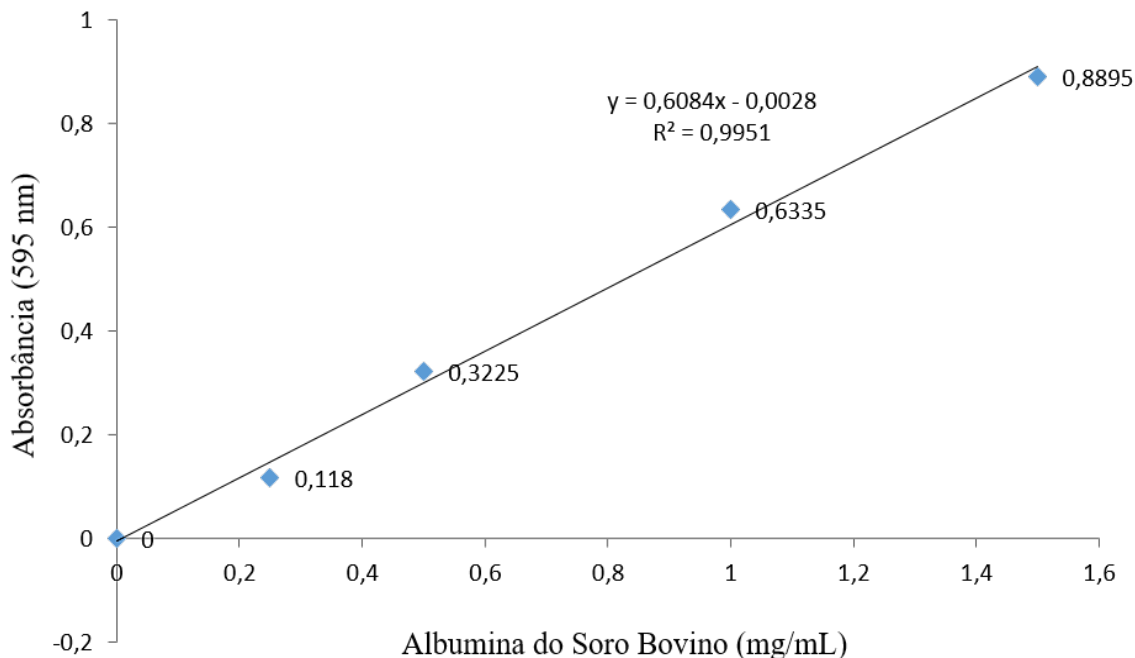
Na Figura 14, tem-se a curva padrão de xilose, utilizada para a quantificação da atividade enzimática, calculada a partir da determinação dos açúcares redutores liberados na reação de hidrólise da xilana, segundo o método de Miller (1959).

Figura 14 - Curva padrão de xilose utilizada para a quantificação da atividade enzimática, conforme o método de Miller (1959).



Para a quantificação de proteínas produziu-se uma curva analítica com BSA, conforme o método de Bradford (1976), apresentada na Figura 15.

Figura 15 - Curva padrão de albumina do soro bovino (BSA), utilizada na quantificação de proteínas pelo método de Bradford (1976).



Observa-se nas Figuras 14 e 15 que os valores de absorbância obtidos, quando utilizados para a confecção dos gráficos, se ajustam à equação da reta, com fator  $R^2$  próximo de 1. Portanto, verifica-se que ambas as curvas padrão se apresentaram de acordo com o esperado, e as reações realizadas são confiáveis para o cálculo da atividade enzimática e da concentração proteica das amostras testadas.

#### 4.2 PRODUÇÃO DE XILANASE FÚNGICA

O valor de atividade enzimática de xilanase obtido ao final do cultivo fúngico (caldo fermentado) foi 6,87 U/mL. Em um estudo anterior, onde o fungo *Aspergillus* sp. F36 foi selecionado como bom produtor de xilanase, Matias et al. (2019) obtiveram valor máximo de atividade enzimática de 17 U/mL, após 48 h de cultivo em meio líquido. As autoras

prepararam o inóculo fúngico de forma diferente ao realizado no presente estudo, com pré-cultivo em ágar contendo xilana, o que pode explicar a diferença na produção de xilanase.

A produção de xilanase depende de diferentes fatores, como linhagem fúngica e condições de cultivo. Elegbede e Lateef (2018) avaliaram a produção de xilanase em fungos do gênero *Aspergillus*, como *A. niger*, *A. fumigatus* e *A. flavus*, obtendo o valor máximo de 44,81 U/mL de atividade de xilanase. Por outro lado, Ahmed et al. (2016) obtiveram uma atividade xilanolítica de 1,86 U/mL, utilizando o fungo *A. terreus* KP900973. Ferreira (2016), estudando a produção e caracterização de xilanase produzida por isolados fúngicos filamentosos oriundos de solo, em cultivo sólido, demonstrou a influência do substrato em dois dos seis isolados testados; estes obtiveram a maior produção enzimática quando cultivado na mistura bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo por 72 h, obtendo 27,08 U/mL.

#### 4.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Utilizou-se o planejamento experimental como ferramenta para a avaliar as melhores condições de recuperação da xilanase fúngica por micelas reversas de CTAB. Foram selecionadas duas variáveis: concentração do tensoativo CTAB e força iônica, empregando-se isoctano como solvente e butanol como co-solvente. As variáveis resposta para o planejamento experimental foram a atividade enzimática específica (AE), e o rendimento em atividade, ou Recuperação (Y).

Os valores de atividade enzimática e de teor proteico obtidos ao final do cultivo fúngico foram 6,87 U/mL e 0,769 mg/mL, respectivamente. Na Tabela 4 encontram-se os valores de atividade enzimática (U/mL) e de concentração de proteínas totais (mg/mL) obtidos após a extração da xilanase do meio de cultivo fúngico, utilizando o método ELL por SMR, nos diferentes ensaios do DCCR.

Nas condições experimentais avaliadas foram observadas atividades enzimáticas entre 5,38 e 13,9 U/mL após a extração líquido-líquido por SMR (Tabela 4). O valor máximo de 13,9 U/mL foi obtido no ensaio 6, onde foi utilizada a maior concentração de tensoativo (0,564 M) e o valor intermediário da força iônica (12,0 mS/cm). Hasmann; Pessoa Jr. e Roberto (2001) demonstraram que, sob condições alcalinas (pH 8,0), a concentração de

tensoativo (CTAB) e de butanol são as principais variáveis que influenciam nos resultados de recuperação da enzima  $\beta$ -xilosidase.

Tabela 4 - Atividade enzimática e concentração de proteínas totais após a extração da xilanase pelo método ELL por SMR, nos diferentes ensaios do DCCR

Ensaio	Tensoativo	Força iônica	Atividade enzimática <sup>a</sup> (U/mL)	Proteínas Totais <sup>b</sup> (mg/mL)
1	-1	-1	7,47± 0,16	0,69± 0,02
2	1	-1	9,63± 0,12	0,66± 0,01
3	-1	1	5,38± 0,13	0,50± 0,01
4	1	1	12,33± 0,20	0,50± 0,01
5	-1,41	0	11,31± 0,16	0,54± 0,01
6	1,41	0	13,93± 0,05	0,55± 0,01
7	0	-1,41	7,61± 0,10	0,73± 0,02
8	0	1,41	5,98± 0,03	0,53± 0,01
9	0	0	5,43± 0,20	0,51± 0,01
10	0	0	5,82± 0,04	0,55± 0,01
11	0	0	5,66± 0,16	0,54± 0,03

<sup>a,b</sup>Valores representam a média  $\pm$  desvio padrão obtidos nos experimentos realizados em triplicata. Valores encontrados para o caldo fermentado (antes de extração): Atividade enzimática = 6,87 U/mL  $\pm$  0,12 e Concentração total de proteínas = 0,769 mg/mL  $\pm$  0,02.

Verifica-se na Tabela 4 que as condições experimentais testadas neste estudo não inibiram a atividade enzimática das xilanasas após a extração pelo SMR, o que demonstra que o método pode ser empregado para a recuperação dessas enzimas do meio de cultivo do fungo *Aspergillus* sp. F36.

Na Tabela 5, observam-se os valores obtidos de atividade enzimática específica (AE), de rendimento em proteínas ( $\eta$ ), de Recuperação (Y) e do Fator de Purificação (FP) para os diferentes ensaios realizados a partir do DCCR.

A atividade enzimática específica para a xilanase ficou entre 10,46 e 24,69 U/mg, com rendimento proteico máximo no valor de 0,95 (Tabela 5), após a extração por SMR. O

método de extração utilizando CTAB por SMR se mostrou eficiente na recuperação da enzima xilanase, visto que houve aumento no fator de purificação ( $> 1$ ), bem como na atividade específica, cujo valor era de 8,93 U/mg após o cultivo. O resultado positivo observado pelo valor obtido no fator de purificação, demonstra que o método SMR pode ser utilizado para o isolamento da enzima de interesse.

O valor de rendimento total de proteínas (np) demonstrou que o método apresenta uma alta seletividade na extração da enzima nas condições estudadas, além de favorecer na manutenção de sua integridade (HASMANN, 2000).

Tabela 5 - Resultados obtidos nos ensaios do Delineamento Composto Central Rotacional, para avaliação das melhores condições de extração de xilanase fúngica.

Ensaio	Variáveis independentes		Variáveis resposta			
	Tensoativo	Força iônica	AE (U/mg)	np	Y (%)	FP
1	-1	-1	10,88	0,89	108,7	1,22
2	1	-1	14,71	0,85	140,1	1,65
3	-1	1	10,87	0,64	78,3	1,22
4	1	1	24,69	0,65	179,4	2,76
5	-1,41	0	20,94	0,70	164,7	2,34
6	1,41	0	25,42	0,71	202,7	2,84
7	0	-1,41	10,46	0,95	110,8	1,17
8	0	1,41	11,26	0,69	87,0	1,26
9	0	0	10,58	0,67	79,1	1,18
10	0	0	10,64	0,71	84,6	1,19
11	0	0	10,54	0,70	82,4	1,18

AE = Atividade enzimática específica (U/mg); np = Rendimento expresso em proteínas totais; Y = Rendimento expresso em atividade; FP = Fator de purificação.

Os tensoativos promovem a transferência de proteínas através das fases, seguindo as interações eletrostáticas (HASMANN, 2000). Neste caso, é provável que a utilização de maiores concentrações do tensoativo tenham promovido a formação de micelas maiores e em maior número, sendo capazes de encapsular uma maior quantidade de enzimas e assim

resultando numa maior atividade enzimática, como observado no ensaio de número 6 (0,564 M CTAB e 12,0 mS/cm força iônica) do planejamento experimental.

Como pode ser observado na Tabela 5, o rendimento variou entre 79% e 202%, de acordo com as condições experimentais dos ensaios realizados. Jaramillo et al. (2013) e Cavalcanti et al. (2006) obtiveram valores de rendimento para extração de 375,5% e 230% utilizando SMR para pectinase com Triton X-114 e para a fosfolipase C com PEG/fosfato (polietilenoglicol), respectivamente. Balanços acima de 100% podem ser obtidos devido à migração de proteínas inibitórias presentes na solução testada, assim como impurezas e compostos fenólicos. Após a re-extração a enzima encontra-se armazenada numa solução tampão que favorece a atividade enzimática, de acordo com o pH ótimo da enzima. Os compostos fenólicos são passíveis de inibir reações enzimáticas, especialmente em caldos fermentados, dificultando sua aplicação em processos industriais (MAYERHOFF; ROBERTO e FRANCO, 2006; CAVALCANTI et al., 2006).

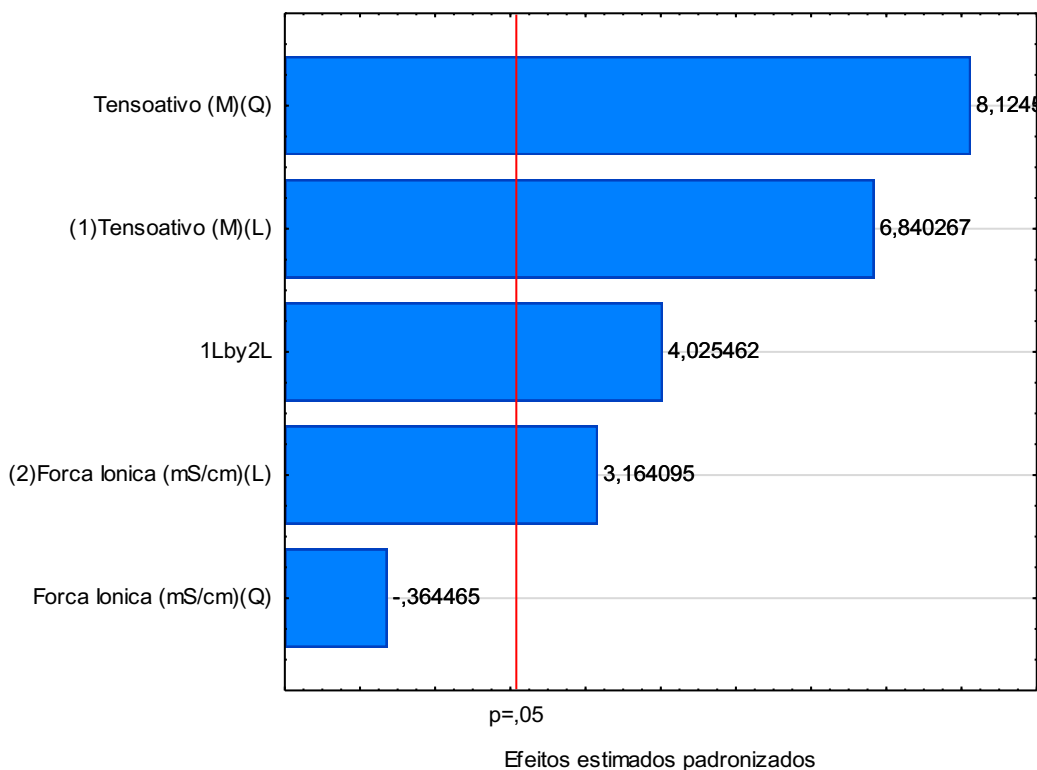
No diagrama de Pareto da Figura 16, pode-se visualizar os fatores que apresentam influência sobre a atividade enzimática específica (AE). Neste gráfico, o comprimento de cada barra é proporcional ao efeito induzido pela variável relacionada ou sua interação, e as barras que se estendem além da linha vertical, correspondem aos efeitos estatisticamente significativos a um nível de confiança de 95%.

Observa-se na Figura 16 que houve significância estatística ( $p < 0,05$ ) para o tensoativo e para a força iônica e que o aumento na concentração do tensoativo e da força iônica causam o aumento da atividade enzimática da xilanase, sendo o tensoativo mais significativo, uma vez que possui um efeito maior.

Os efeitos da força iônica na fase aquosa inicial interagem na transferência das proteínas para o interior das micelas, de acordo com as interações eletrostáticas entre ambas. O aumento da força iônica, pode levar a uma redução das forças eletrostáticas entre os grupos polares do tensoativo (efeito “Debye”). Sendo assim, à medida que a força iônica da solução proteica aumenta as interações entre a proteína e o agente tensoativo diminuem, ocasionando então uma diminuição no tamanho desta micela e a consequente exclusão da proteína. Isso ocorre devido à redução do efeito repulsivo dos grupos polares do agente tensoativo, levando a um decréscimo do transporte de água ou outras moléculas, tendo como consequência a formação de menos e de menores micelas reversas (CABRAL e AIRES-BARROS, 1993).

Quando essa força iônica é elevada, existe um efeito protetor dos grupamentos polares dos agentes tensoativos contra as proteínas, causando uma solubilização eletrostática desfavorável (ANDREWS; PYLE e ASENJO, 1994). A condutividade elétrica controla a solubilização de proteínas no sistema micelar e, portanto, os valores de força iônica estudados se mostraram benéficos para a formação das micelas de CTAB.

Figura 16 - Diagrama de Pareto para as variáveis tensoativo e força iônica quanto à atividade enzimática específica de xilanase, após extração por SMR.



As Figuras 17 e 18 mostram a superfície de resposta que representa a atividade específica (U/mg) das xilanases em função das variáveis CTAB e força iônica. Na Figura 18, verifica-se que de acordo com as condições utilizadas neste estudo experimental, nas maiores concentrações do tensoativo (M), houve maior atividade enzimática específica da xilanase. Esta mesma figura mostra a superfície de resposta que representa a atividade enzimática em função das variáveis do tensoativo (M) e da força iônica (mS/cm), com valores que vão de < 8 a >50 U/mg. É possível observar na superfície de resposta que a atividade máxima obtida

neste modelo é maior que 50 U/mg. Além disso, através das linhas de contorno, percebe-se que a otimização do processo tende para a região periférica dos intervalos estudados.

Figura 17 - Superfície de resposta para a atividade específica de xilanase (U/mg) em função das variáveis estudadas (tensoativo CTAB e força iônica).

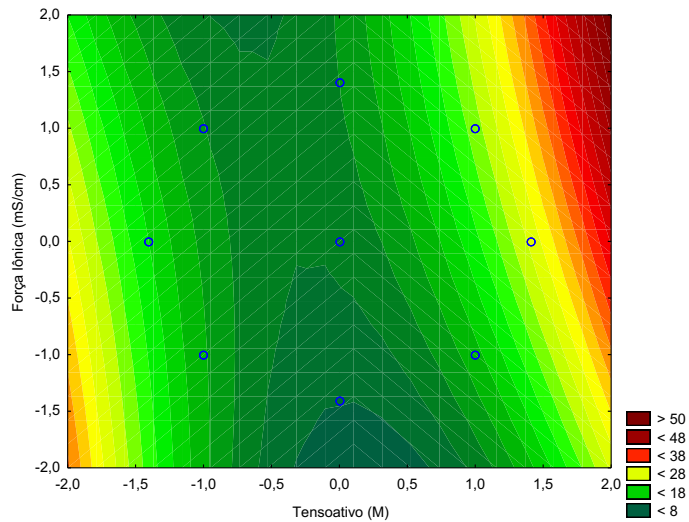
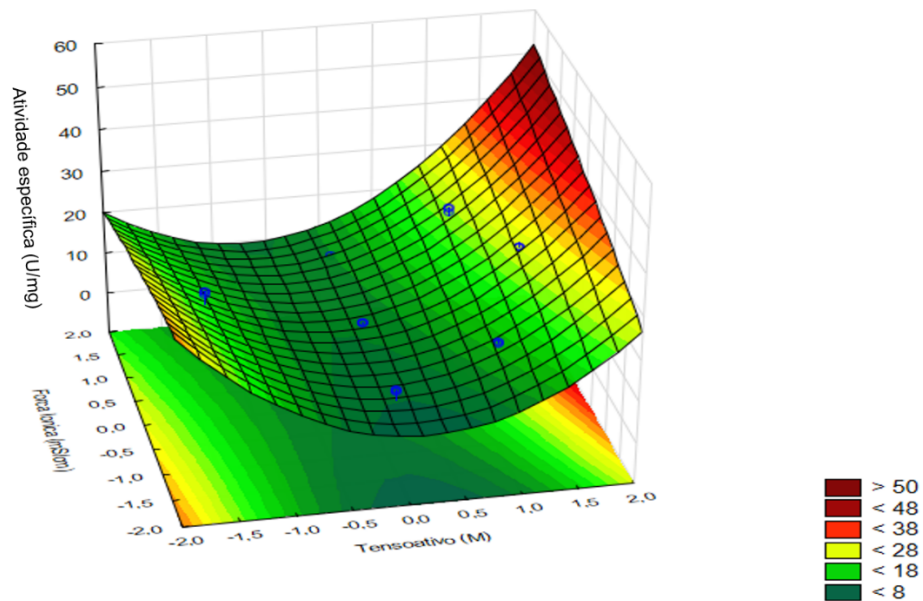
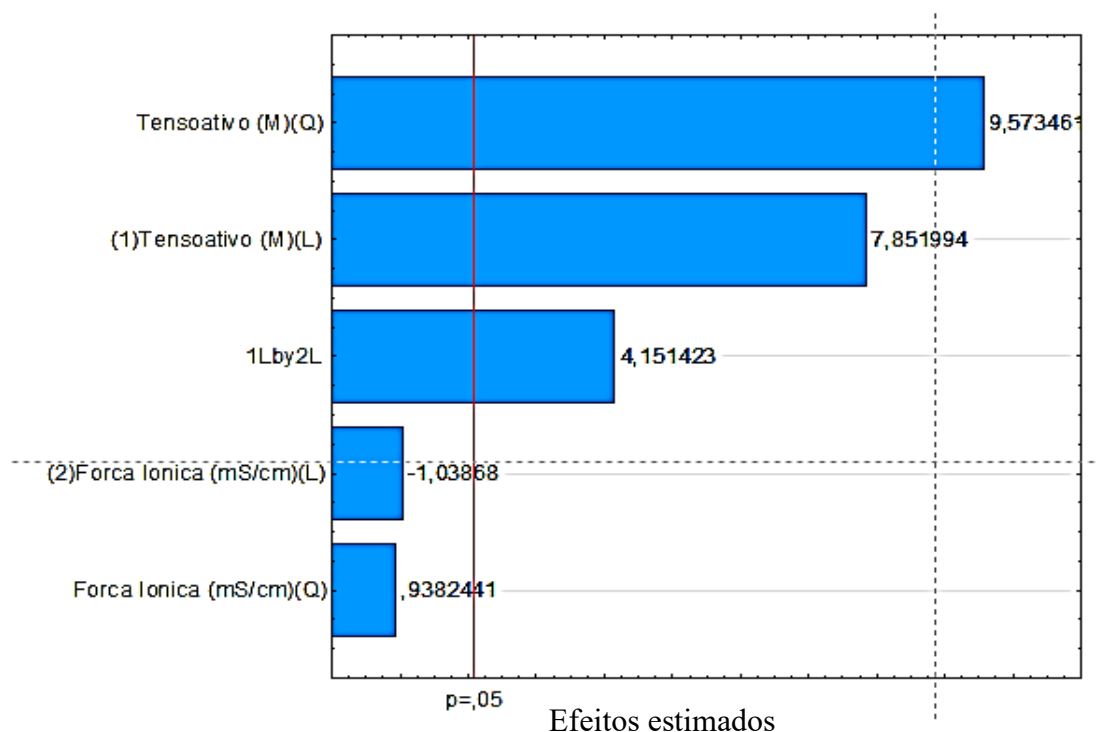


Figura 18 - Superfície de resposta para a atividade específica de xilanase (U/mg) após extração por micela reversa, em função da concentração de CTAB e da força iônica.



No diagrama de Pareto da Figura 19, pode-se visualizar os fatores que apresentam influência sobre o rendimento em recuperação enzimática (Y). Avaliando-se a Figura 19 é possível observar que houve significância estatística ( $p < 0,05$ ) para o tensoativo, ao contrário do observado para a força iônica. De acordo com as análises, o aumento na concentração do tensoativo (efeito positivo) causa aumento do rendimento em recuperação enzimática. O aumento da concentração de surfactante aumenta o número de micelas na fase orgânica, assim, a eficiência da extração também é melhorada. Já a força iônica isoladamente não apresenta influência sobre a Recuperação. Contudo, a combinação entre ambos os fatores se revelou positiva, ou seja, as duas variáveis estudadas, quando em seus níveis superiores, promovem o aumento de Y.

Figura 19 – Diagrama de Pareto para as variáveis utilizadas no estudo experimental (tensoativo e força iônica), quanto ao % de recuperação da xilanase (Y), após extração por SMR.



O tensoativo CTAB, é uma molécula catiônica, que pode interagir negativamente com grupos carregados, localizados nas cadeias laterais de aminoácidos por interação eletrostática, levando à alteração da carga global da macromolécula ou interferindo no grau

de ionização de tais grupos de aminoácidos (CORTEZ et al., 2006). Já a força iônica é um dos principais parâmetros facilmente controláveis para aumentar a quantidade de biomolécula de interesse no sistema micelar. Seu efeito é geralmente explicado pelo efeito de triagem Debye das soluções eletrolíticas. De acordo com a lei de limitação de Debye-Hückel, conforme o aumento da força iônica de uma solução, o coeficiente de atividade de um íon diminui. Portanto, este efeito de triagem eletrostática também é responsável pela diminuição das repulsões do grupo da cabeça do surfactante, uma vez que à medida que a concentração de sal é aumentada, as camadas duplas elétricas tornam-se mais finas e permitem que os potenciais se aproximem mais um do outro levando à formação de menores micelas reversas para o sistema usado. No entanto, o tamanho da micela reversa diminui com o aumento da adição de sal até atingir uma concentração crítica, o que caracteriza o início da desestabilização do sistema (MONTEIRO et al., 2005; FATHI et al., 2012). Elevadas concentrações de sal podem acarretar a desnaturação de enzimas. Assim como tem-se o conhecimento de que a força iônica pode afetar o tamanho da micela, visto que os grupamentos polares dos tensoativos se repelem. Conseqüentemente, micelas maiores são formadas, quando submetidas à menores valores de força iônica (ANDREWS; PYLE e ASENJO, 1994).

Na Tabela 6 estão apresentados os efeitos estimados para os fatores analisados na extração de xilanase fúngica por SMR.

Tabela 6 – Efeitos estimados para a recuperação da atividade de xilanase (Y), obtidos a partir do planejamento experimental DCCR\*.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t (21)	P	-95, % Coef Limt"	+95, % Coef Limt"
<b>Mean/Interc.</b>	<b>80,52525</b>	<b>8,219216</b>	<b>9,79719</b>	<b>0,000000</b>	<b>63,4325</b>	<b>97,6180</b>
Tensoativo $X_1$	<b>45,70438</b>	<b>5,820735</b>	<b>7,85199</b>	<b>0,000000</b>	<b>33,5995</b>	<b>57,8093</b>
Tensoativo $X_1^2$	<b>92,59391</b>	<b>9,671937</b>	<b>9,57346</b>	<b>0,000000</b>	<b>72,4800</b>	<b>112,7078</b>
Forca Ionica $X_2$	-6,04589	5,820735	-1,03868	0,310765	-18,1508	6,0590
Forca Ionica $X_2^2$	9,07464	9,671937	0,93824	0,358786	-11,0393	29,1885
$X_1 X_2$	<b>34,12266</b>	<b>8,219508</b>	<b>4,15142</b>	<b>0,000452</b>	<b>17,0293</b>	<b>51,2161</b>

\*Variáveis significativas destacadas em vermelho ( $p < 0,05$ ).

A Tabela 7 apresenta a ANOVA do conjunto de dados experimentais das variáveis utilizadas na extração de xilanase fúngica por SMR. O valor de F permite determinar se a relação entre a recuperação da atividade enzimática (Y) e as variáveis estudadas é estatisticamente significativa. Se o valor de F for maior que 1,0 existirá relação significativa entre as variáveis dependente e independente, e para que o modelo matemático seja útil para fins preditivos o parâmetro F deverá ser superior a 4,0 (BARROS NETO; SCARMINIO e BRUNS, 1995). Portanto, observa-se que a variável concentração de tensoativo é significativa, para o modelo linear e quadrático, assim como sua interação com a força iônica e que o valor de F, maior que 4,0, indica que estas variáveis podem ser utilizadas no modelo matemático para fins preditivos do valor de Y.

Tabela 7 – Efeitos estimados para os fatores analisados no processo de extração de xilanase por micelas reversas\*.

Fator	SQ	GL	MQ	F	P
Tensoativo $X_1$	12496,05	1	12496,05	61,65381	0,000000
Tensoativo $X_1^2$	18575,94	1	18575,94	91,65115	0,000000
Força Ionica $X_2$	218,66	1	218,66	1,07886	0,310765
Força Ionica $X_2^2$	178,42	1	178,42	0,88030	0,358786
$X_1 X_2$	3493,07	1	3493,07	17,23432	0,000452
Erro	4256,30	21	202,68		
Total SS	47992,81	26			

ANOVA: SQ = soma quadrática, GL = graus de liberdade, MQ = média quadrática 0,91131. \*Variáveis significativas, destacadas em vermelho ( $p < 0,05$ ).

No diagrama de Pareto apresentado na Figura 19, observa-se claramente que as funções quadráticas e lineares para o tensoativo são significativas ( $p < 0,05$ ), assim como a interação entre o tensoativo e a força iônica, todas com efeitos positivos sobre o rendimento de recuperação da enzima (Y%).

Através da análise de variância da regressão obtida (Tabela 7), pode ser constatado que o modelo é altamente significativo ( $p < 0,001$ ) e apresenta um bom coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,91131$ ), o que indica uma boa representação matemática do processo em estudo, ou seja, cerca de 91% da variação total em torno da média pode ser explicada pelo modelo e os restantes 9% representam os resíduos. O modelo obtido para descrever a

recuperação da enzima xilanase (Y%), na região em estudo, pode ser expresso pela Equação 7 descrita a seguir.

$$Y (\%) = 80,525 + 45,704 * T + 92,594 * T^2 - 6,046 * FI + 9,075 * FI^2 + 34,123 * T * FI \quad (7)$$

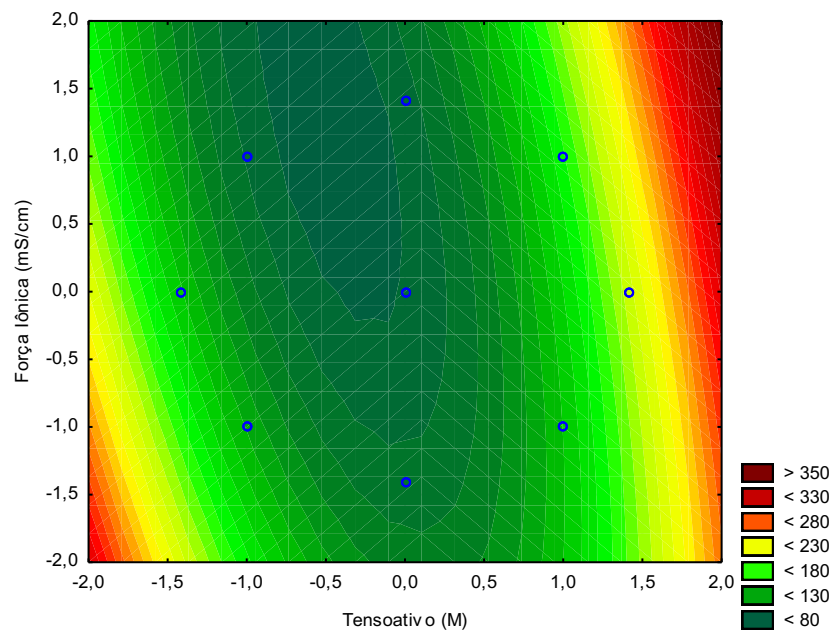
Onde

T = Tensoativo (M)

FI = Força Iônica (mS/cm)

A partir Software TIBCO STATISTICA™ v. 14.0, foram obtidos os valores críticos de cada uma das variáveis: Tensoativo = -0,47 e Força iônica = 1,22, que correspondem, respectivamente, a 0,253 M de concentração de tensoativo e 13,830 mS/cm de força iônica. Estes valores críticos correspondem a um ponto de mínimo, como pode ser observado na Figura 20, que apresenta a superfície de resposta obtida a partir dos resultados do DCCR para a recuperação da atividade enzimática de xilanase (Y).

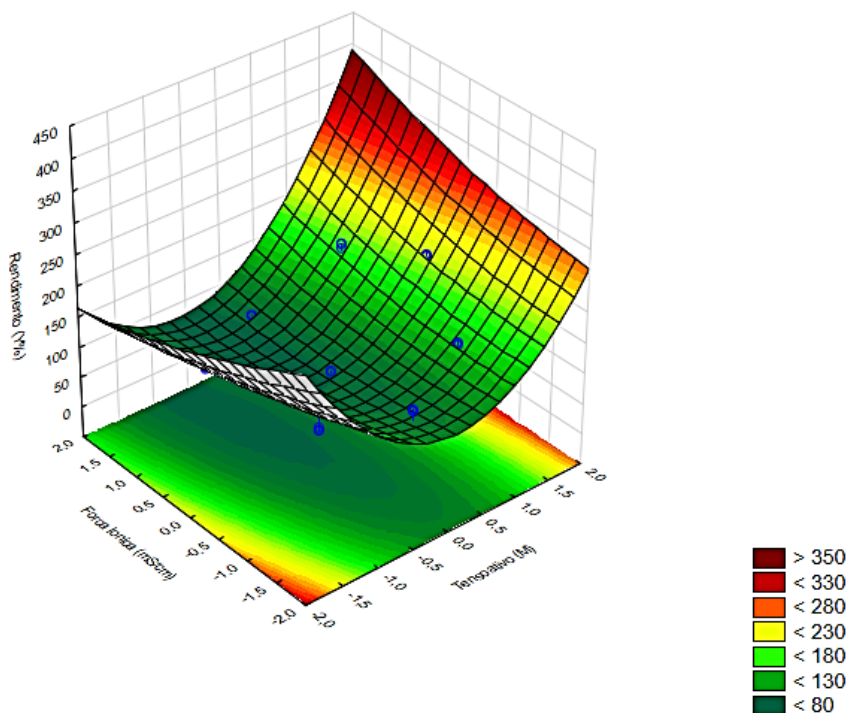
Figura 20 – Superfície de resposta para o rendimento expresso em atividade ou recuperação da xilanase (Y) em função das variáveis estudadas (tensoativo CTAB e força iônica).



A superfície de resposta apresentada na Figura 20 indica que de acordo com as condições utilizadas neste estudo experimental, nas maiores concentrações do tensoativo (M), bem como, em valores intermediários da força iônica, houve maior recuperação da xilanase.

A Figura 21 mostra a superfície de resposta que representa o rendimento das xilanases (Y) em função das variáveis CTAB e força iônica. É possível observar na superfície de resposta que o rendimento máximo obtido neste modelo é em torno de 400%. Além disso, através das linhas de contorno, percebe-se que a otimização do processo tende para a região periférica dos intervalos estudados.

Figura 21 - Superfície de resposta para o rendimento da extração de xilanase por micela reversa em função da concentração de CTAB e da força iônica.



Cortez et al. (2002) otimizaram o processo de extração da enzima  $\beta$ -xilosidase, produzida pelo fungo *Penicillium janthinellum*, extraído pelo sistema micelar reverso formado pelo também agente tensoativo catiônico CTAB, mas testando com isoctano, hexanol e butanol. Os efeitos combinados da concentração de CTAB e de butanol sobre a extração da enzima foram estudados empregando-se a metodologia de superfície de resposta.

A partir dos resultados obtidos, os autores propuseram um modelo matemático para descrever o processo de extração da  $\beta$ -xilosidase na região de trabalho estudada. De acordo com a equação do modelo, foram obtidos valores máximos de recuperação de  $35,05 \pm 6,40\%$  nas seguintes condições: pH 8,0, concentração de CTAB 0,2 M, concentração de hexanol 5% e concentração de butanol 20%. Nestas condições, foram realizados novos experimentos e o valor médio de recuperação obtido foi de 38%. Para os autores, o processo de extração por micelas reversas de CTAB mostrou-se adequado para a recuperação da enzima  $\beta$ -xilosidase diretamente do meio fermentado. Nos ensaios realizados no presente estudo, também se observa a recuperação da atividade enzimática após o processo de extração pelo SMR e tal qual Hasmann; Pessoa Jr. e Roberto (2001), verifica-se que a concentração do tensoativo (CTAB) é uma variável que pode influenciar diretamente nos resultados de recuperação enzimática. Futuramente deverão ser realizados novos experimentos para se alcançar as condições ótimas e a consequente adequação para um modelo experimental mais completo.

Devido ao interesse industrial cada dia mais evidente, torna-se necessário se intensificar e melhor explorar métodos que sejam mais eficazes e que favoreçam um melhor sistema de extração e de recuperação de enzimas com reduzida perda de sua atividade, a exemplo o método de extração utilizado neste estudo. A extração líquido-líquido pode, portanto, se tornar uma alternativa que favoreça a maior qualidade e quantidade de extração enzimática e sua atividade.

## 5 CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos e metodologias empregadas para a execução deste estudo experimental, conclui-se que o processo de extração por micelas reversas de CTAB mostrou-se adequado para a recuperação das xilanases fúngicas. Foi detectada a produção da enzima no caldo fermentado e a manutenção da atividade enzimática após ELL por SMR em todas as condições experimentais utilizadas, onde variou-se a concentração de tensoativo e a força iônica;

Avaliou-se através do planejamento experimental a influência das variáveis estudadas, sendo o agente tensoativo CTAB isoladamente, bem como, sua combinação com a força iônica significativas para a extração da xilanase; obteve-se ainda um modelo matemático que descreve o comportamento da recuperação enzimática frente as variáveis no intervalo estudado;

Após a realização do processo de extração líquido-líquido por sistema micelar reverso diretamente do meio fermentado pelo fungo endofítico, foi possível verificar a recuperação da atividade enzimática das xilanases, em comparação com o grupo controle do ensaio; obtendo-se valor máximo de 13,9 U/mL. O aumento no fator de purificação ( $> 1$ ), bem como na atividade específica reforçam a eficiência na recuperação de xilanases, pelo método de extração por micelas reversas com o tensoativo CTAB;

Foi determinada a atividade específica e o índice de purificação a partir dos ensaios propostos no planejamento experimental, demonstrando que o método proposto foi eficiente e seletivo para a enzima objeto deste estudo.

## **6 PERSPECTIVAS**

O processo de extração por micelas reversas de CTAB mostrou-se adequado para a recuperação enzimática diretamente do meio fermentado, no entanto, novos estudos se fazem necessários para otimizar o processo, inclusive comparando com outros tipos de tensoativos, variando os solventes e co-solventes, além do pH e temperatura.

## REFERÊNCIAS

- ADSUL, M.; SANDHU, S. K.; SINGHANIA, R. R.; GUPTA, R.; PURI, S. K.; MATHUR, A. Designing a cellulolytic enzyme cocktail for the efficient and economical conversion of lignocellulosic biomass to biofuels. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 133, p. 109442, 2020.
- AHMED, S. A.; SALEH, S. A. A.; MOSTAFA, F. A.; ABD EL ATY, A. A.; AMMAR, H. A. M. Characterization and valuable applications of xylanase from endophytic fungus *Aspergillus terreus* KP900973 isolated from *Corchorus olitorius*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v.7, 134-144, 2016.
- AIRES-BARROS, M. R. Selective separation and purification of two lipases from *Chromobacterium viscosum* using AOT reversed micelles. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, n. 11, p. 1302-1307, 1991.
- AMID, M. Y.; ABD, A.; FARHANA, H.; MUHAINI, S. M. L. A novel liquid/liquid extraction process composed of surfactant and acetonitrile for purification of polygalacturonase enzyme from *Durio zibethinus*. **Journal of Chromatography. B. Biomedical Applications**, v.1, p. 993-994, 2015.
- ANDREWS, B. A.; PYLE, D. L.; ASENJO, J. A. The effect of pH and ionic strength on partitioning of four proteins in reverse micelle systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 43, p. 1048-1052, 1994.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W. **Introductory Mycology**. 4a ed. New York: John Wiley & Sons. 869p. 1996.
- AZEVEDO, E.; BARATA, M. Diversidade no reino Fungi e aplicações à Indústria, **Revista Ciência Elementar**, v.6, n. 4, p. 1-7, 077 p., 2018.
- BAJPAI, P. **Xylanolytic Enzymes**. Cambridge: Academic Press. 2014.
- BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p.495-508, 2000.
- BANHOS, E. F.; SOUZA, A. Q. L.; ANDRADE, J. C.; SOUZA, A. D. L.; KOOLEN, H. H. F.; ALBUQUERQUE, P. M. Endophytic fungi from *Myrcia guianensis* at the Brazilian Amazon: Distribution and bioactivity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 153-161, 2014.
- BARROS, K. V. G. **Sistema de duas fases aquosas NAPA/PEG aplicado na purificação de proteases produzida por fungos filamentosos**. Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas. Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**, vol. 2. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S.A. 1984.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2ª ed., Campinas: Ed. da Unicamp, 1995.

BORRACINI, H. M. P. **Estudo do processo de extração da bromelina por micelas reversas em sistema descontínuo**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2006.

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.

CABRAL, J. M. S., AIRES-BARROS, M. R. **Reversed micelles in liquid-liquid extraction**. In: KENNEDY, J. F., CABRAL, J. M. S. (eds.). *Recovery Processes for Biological Materials*. Chichester: John Wiley & Sons. p.247-271. 1993.

CAMPOS, C. F. A.; RODRIGUÊS, K. F.; VAZ, R. G. M. V.; GIANNES, G. C.; SILVA, G. F.; PARENTE, I. P.; AMORIM, A. F.; BARBOSA, A. F. C.; SILVA, M. C.; FONSECA, F. L. R.; ARAÚJO, C. C.; SILVA, V. S.; SILVA, J. R.; SILVA, E. M.; CAMPOS, M. L.; MACHADO, S. B. Enzimas fúngicas em dietas com alimentos alternativos para frangos de crescimento lento. **Revista Desafios**, v. 4, n. 2, p. 35-53, 2017.

CAVALCANTI, M. T.; PORTO, T. S.; BARROS NETO, B.; LIMA-FILHO, J. L.; PORTO A. L.; PESSOA Jr., A. Aqueous two-phase systems extraction of alpha-toxin from *Clostridium perfringens* type A. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 833, p. 135-140, 2006.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C.R., ARAUJO, A. R. Endophytic fungi: an unexplored and sustainable source of new and bioactive natural products. **Revista Virtual de Química**. v. 5, n. 3, p. 421-437, 2013.

COLLINS, T; GERDAY, C; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 03-23, 2005.

CORTEZ; D. V.; HASMANN; F. A.; PESSOA JR., A.; ROBERTO, I. C. Otimização do processo de extração de  $\beta$ -xilosidase por sistemas micelares reversos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 4, p. 451-456, 2002.

CORTEZ, E. V.; PESSOA Jr., A.; FELIPE, M. G. A.; ROBERTO, I. C.; VITOLO. M. Characterization of xylose reductase extracted by CTAB-reversed micelles from *Candida guilliermondii* homogenate. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n.2, p. 251-257, 2006.

CRUZ, F. G.; CERQUEIRA, M. D.; ROQUE, N. F. MARTINS, D. GUEDES, M. L. S.; MARQUES, E. J. Componentes voláteis de quatro espécies do gênero *Myrcia* (Myrtaceae). **25a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2002.

CRUZ, F. G.; CERQUEIRA, M. D.; ROQUE, N. F. MARTINS, D. GUEDES, M. L. S.; MARQUES, E. J. Composição química dos óleos voláteis de *Myrcia salzmannii* Berg (Myrtaceae) em diferentes meses do ano. **XXVI Congresso Latinoamericano de Química**, 2004.

CRUZ, K, G. **Sistemas microemulsionados à base de tensoativos hidrocarbônicos para aplicação como suportes para dispersão de compostos antibióticos**. Dissertação de Mestrado - Curso de Agroquímica, Universidade Federal de Viçosa, 97p., 2013.

DALTIN D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. São Paulo: Blucher, 344 p., 2012.

ELEGBEDE, J. A.; LATEEF, A. Valorization of corn-cob by fungal isolates for production of xylanase in submerged and solid state fermentation media and potential biotechnological applications. **Waste and Biomass Valorization**, v. 9, n. 8, p. 1273-1287, 2018.

FATHI, H.; KELLY, J. P.; VASQUEZ, V. R.; GRAEVE; O. A. Ionic concentration effects on reverse micelle size and stability: implications for the synthesis of nanoparticles. **Langmuir**, v. 28, p. 9267-9274, 2012.

FELIPE, L. O.; DIAS, S. C. Surfactantes sintéticos e biossurfactantes: vantagens e desvantagens. **Química Nova na Escola**. v. 39, n. 3, p. 228-236, 2017.

FERREIRA, L. L. **Produção e caracterização de xilanase produzida por isolados fúngicos**. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Faculdade de Engenharia Campus de Ilha Solteira, 31 p., 2016.

FERREIRA, F. M.; FORZZA, R. C. Florística e caracterização da vegetação da Toca dos Urubus, Baependi, Minas Gerais, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 9, p.131 -148, 2009.

GOMES, E.; GUEZ, M. A.; MARTIN; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, n. 1, 2017-10-13, p.136-145, 2007.

GOMES, K. S. **Purificação e caracterização de xilanases do fungo *Chrysosporthe cubensis* e utilização na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil, 59 p., 2014.

GONZÁLEZ, M. G; RUIZ, F. R **Aqueous Two-Phase Systems for the Recovery of Bioparticles**. Monterrey: Springer International Publishing AG, p. 55-78, 2017.

GOVAERTS, R.; SOBRAL, M.; ASHTON, P.; BARRIE, F.; HOLST, B. K.; LANDRUM, L. L.; MATSUMOTO, K.; MAZINE, F. F.; NIC LUGHADHA, E.; PROENÇA, C.;

SOARES-SILVA, L. H.; WILSON, P. G.; LUCAS, E. **World Checklist of Myrtaceae**. Kew Publishing, Royal Botanic Gardens, Kew. 2008.

HASMANN, F. A. **Extração líquido-líquido de 3-xilosidase por micelas reversas**. Dissertação de mestrado. Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Departamento de Biotecnologia, Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, 107 p. 2000.

HASMANN, F. A.; PESSOA JR., A.; ROBERTO, I. C. Screening of variables in  $\beta$ -xilosidase recovery using cetyl trimethyl ammonium bromide reversed micelles. **Applied Biochemical and Biotechnology**, v. 91-93, p. 719-728, 2001.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, p.1422-1432, 2001.

JARAMILLO, P. M. D.; GOMES, H. A. R.; SIQUEIRA, F. G.; HOMEM-DE-MELLO, M. FERREIRA FILHO, E. X.; MAGALHÃES, P. O. Liquid-liquid extraction of pectinase produced by *Aspergillus oryzae* using aqueous two-phase micellar system. **Separation and Purification Technology**, 120, p. 452-457, 2013.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial exo-xylanases: a mini review. **Applied Biochemical and Biotechnology**, v. 174, n. 1, p. 81-92, 2014.

KAVANAGH, K. **Fungi – biology and applications**. 2a ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2005.

KILIKIAN, B. V.; BASTAZIN, M. R.; MINAMI, N. M.; GONÇALVES, E. M. R.; JUNIOR, A. P. Liquid-liquid extraction by reversed micelles in biotechnological processes. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 17, n.1, p. 29-38, 2000.

KIRK O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 345-351. 2002.

KREI, G. A.; HUSTEDT, H. Extraktion von Enzymen mittels reverser Mizellen. **Bioengineering**, v. 3/4, p. 32-41, 1989.

KUSTER, R. M.; NETO, J. C.; SILVA, A. J. R.; AMORIM, M. B.; FELIX, C. F.; SANTOS, P. S.; SCOFANO, H. M. Flavonóides inibidores de ATPases de *Myrcia uniflora* (Myrtaceae). **26a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - SBQ**, 2003.

KUMAR, D.; KUMAR, S. S.; KUMAR, J.; KUMAR, O.; MISHRA, S. V.; KUMAR, R.; MALYAN, S. K. Xylanases and their industrial applications: a review. **Biochemical and Cellular Archives**, v. 17, n. 1, p. 353-360, 2017.

LEGRAND, C. D.; KLEIN, R. M. *Myrcia* (Fasc. Mirt.) In: Reitz, R. (org.). **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, p. 219-330, 1969.

LUIZI, P. L., GIOMINI, M., PILENI, M. P., ROBINSON, B. H. Reversed micelles as hosts for proteins and small molecules. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 947, p. 209-246, 1988.

LNBR/CNPEM. **BIOPROCESSOS. LABORATÓRIO NACIONAL DE BIORRENOVÁVEIS/CNPEM, MCTI.** Disponível em: <https://lnbr.cnpem.br/pt-br/divisoes-de-pesquisa/processostecnologicos/bioprocessos/#:~:text=Bioprocessos20C3A920a20espinha20dorsal,a20produtos20de20origem20renovC3A1vel>. Acesso em 21 de julho de 2021.

MANJREKAR, S.; WADEKAR, T.; SUMANT, O. **Enzymes Market Size & Industry Forecast by 2027.** Disponível em: <https://www.alliedmarketresearch.com/enzymes-market>. Acesso em 15 de novembro de 2021.

MATIAS, R. R. **Produção de enzimas hidrolíticas e avaliação do seu potencial de degradação de biofilme de *Staphylococcus aureus*.** Dissertação. Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia. Universidade do Estado do Amazonas, Amazonas, 154 p. 2018.

MATIAS, R. R.; SEPÚLVEDA, A. M. G.; BATISTA, B. N.; LUCENA, J. M. V. M.; ALBUQUERQUE, P. M. Degradation of *Staphylococcus aureus* biofilm using hydrolytic enzymes produced by Amazonian endophytic fungi. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 193, n. 2, 2145-2161, 2021.

MATIAS, R. R.; SEPÚLVEDA, A. M. G.; BATISTA, B. N.; LUCENA, J. M. V. M.; ALBUQUERQUE, P. M. **Seleção de fungos endofíticos isolados de *Myrcia guianensis* produtores de xilanase. Impactos das tecnologias nas Ciências Biológicas e da Saúde 2.** Christiane Trevisan Slivinski (Org.). Ponta Grossa: Atena Editora. Cap. 8, p. 66 -74, 2019.

MAYERHOFF, Z. D.; ROBERTO, I. C.; FRANCO, T. T. Response surface methodology as an approach to determine the optimal activities of xylose reductase and xylitol dehydrogenase enzymes from *Candida mogii*, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 761-767, 2006.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOHD-SETAPAR, S. H., HARU, S. N. M.-A. N. H.; MOHD-AZIZI, C. Y. Review on the extraction of biomolecules by biosurfactant reverse micelles. **Elsevier Science**, v. 3, p 78-83, 2012.

MONTEIRO, T. I. R. C.; PORTO, T. S.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; SILVA, M. P. C. CARNEIRO-DA-CUNHA; M. G. Reversed micellar extraction of an extracellular protease from *Nocardiosis* sp. fermentation broth. **Biochemical Engineering Journal**, v. 24, p. 87-90, 2005.

MOURA, S. C.; ARAUJO, A. R. B.; SALES, R. M. M.; BARBOSA, M. F.; SOUTO, B. M.; QUIRINO, B. F. **Xilanases microbianas e suas aplicações industriais.** Embrapa Agroenergia, Documentos 38, 50 p. Brasília, DF, 2021.

NASCIMENTO, C. O. **Extração líquido – líquido da lectina da entrecasca de *Crataeva tapia* L. utilizando micelas invertidas.** Mestrado em Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, 65 p. 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger.** 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

OKAFOR, N. **Modern Industrial Microbiology and Biotechnology.** Enfield: Science Publishers, 530 p. 2007.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS JUNIOR, A. F. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Food Science and Technology**, v. 26, n. 4, p. 853-860, 2006.

ORLANDELLI, R. C. SPECIAN, V; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, p.97-109, 2012.

PATEL, M. T.; NAGARAJAN, R.; KILARA, A. Interactive influence and optimization of reaction parameters in the hydrolysis of olive and coconut triacylglycerols by *C. cylindracea* and *R. javanicus* lipases in reverse micellar media. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 59, p. 109-124, 1996.

PAWAR, S.; REGUPATHI, I.; PRASANNA, B. D. Reverse micellar partitioning of bovine serum albumin with novel system. **Resource Efficient Technologies**, v. 3, p. 1-4, 2017.

PIRES, M. J.; AIRES-BARROS; M. R.; CABRAL, J. M. S. Liquid–liquid extraction of proteins with reversed micelles. **Biotechnology Progress**, v. 12, n. 3, p. 2090-301, 1996.

POSCH, A. E.; HERWIG, C.; SPADIUT, O. Science-based bioprocess design for filamentous fungi. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 37- 44, 2013.

RATANAPONGLEKA, K.; Recovery of biological products in aqueous two phase systems. **International Journal of Chemical Engineering and Applications**, v. 1, n. 2, p. 191-198, 2010.

RODRIGUES, E. M. G. **Extração Líquido-líquido de Xilanase por Micela Reversa.** Lorena, Faculdade de Engenharia Química (Dissertação de Mestrado). 100 p., 1997.

RODRIGUES, E. M. G. **Extração líquido-líquido de xilanase por micela reversa numa microcoluna de campanulas pulsadas.** Universidade Federal de Campinas. Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação; Campinas - São Paulo, 121 p., 2001.

ROSSI, T. F. G. C. Tensoativos: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. **Revista da Universidade Rural. Série Ciências Exatas e da Terra**, v. 25, n. 1-2, p. 59-71, 2006.

SCHMIDELL, W; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, v.2, 2016.

SCHULZ, B.; ROMMERT, A.; DAMMANN, U.; AUST, H.; STRACK, D. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? **Mycological Research**, v.103, p. 1275-1283, 1999.

SCHWEITZER, B. **Crescimento dos agregados micelares em complexos de albumina do soro bovino – dodecilsulfato de sódio controlado pela proteína**. Dissertação de Mestrado, UFSC (Departamento de Química), Florianópolis – SC, 2003.

SEOUD, O. A., SANCTIS, D. S., PALMA, E. J. Tensoativos: química e aplicações em cosméticos e detergentes. São Paulo: Associação Brasileira de Química, 1999.

SILVA, M. E. T. **Bioprospecção de moléculas tensoativas em fungos endofíticos de *Piper hispidum* e *Myrcia guianensis***. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado Amazonas - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, Manaus, 83 p., 2015.

SILVERMAN, D. C.; KALOTA, D. J.; STOVER, F. S. Effect of pH on corrosion inhibition of steel by polyaspartic. **Corrosion Science**, v. 51, n. 11, p.818-825, 1995.

SINTRA, T. E.; VENTURA, S. P. M.; COUTINHO J, A. P. Superactivity induced by micellar systems as the key for boosting the yield of enzymatic reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 107, p. 140-151, 2014.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. **Myrtaceae**. In: Forzza, R.C. *et al.* (ed.). Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro., 2010. Disponível em <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB010266>. Acesso em 10 Dez 2020.

SOUSA-GOMES, K. **Purificação e caracterização de xilanases do fungo *Chrysosporthe cubensis* e utilização na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 59 p. 2014.

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

TONOVA, K; LAZAROVA, Z. Reversed micelle solvents as tools of enzyme purification and enzyme catalyzed conversion. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 516-532, 2008.

WANDERLEY NETO, A. O. **Aplicação de sabões de ácidos graxos epoxidados como inibidores de corrosão em oleoduto**. Universidade Federal do Rio Grande do Norte Centro de Ciências Exatas e da Terra Departamento de Química, Programa de Pós-Graduação em química; natal/RN, 224 p. 2009.

ZAMPIERI, D. **Expressão do complexo celulolítico em *Penicillium echinulatum***. Dissertação de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul. 99 p. 2011.

ZAMPIERI, D. **Expressão gênica e atividades de celulases,  $\beta$ -glicosidases, xilanases e swoleninas de *Penicillium echinulatum* S1M29**. Tese de doutorado em Biotecnologia, Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul. 2015.

ZHANG, J.; WANG, Y. E.; PENG, Q. Extraction of theanine from waste liquid of tea polyphenol production in aqueous two-phase systems with cationic and anionic surfactants. separation science and engineering, **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 21, n. 1, p. 31-36, 2013.