

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Danielly Cristina Alves Abreu

**DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS DE AFINIDADE PARA A SEPARAÇÃO
DE BROMELINA**

BELO HORIZONTE - MG
2019

Danielly Cristina Alves Abreu

**DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS DE AFINIDADE PARA A SEPARAÇÃO
DE BROMELINA**

Versão final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Linha de Pesquisa: Processos de Separação.

Orientadora: Profa. Kátia Cecília de Souza Figueiredo.

A162d

Abreu, Danielly Cristina Alves.

Desenvolvimento de membranas de afinidade para a separação de bromelina [recurso eletrônico] / Danielly Cristina Alves Abreu. - 2019.

1 recurso online (86 f. : il., color.) : pdf.

Orientadora: Kátia Cecília de Souza Figueiredo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.

Apêndice: f.86.

Bibliografia: f.76-85.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Engenharia Química - Teses. 2. Bromelina - Teses.
3. Separação de membrana - Teses. 4. Adsorção - Teses.
I. Figueiredo, Kátia Cecília de Souza. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. III. Título.

CDU: 66.0 (043)

Ficha catalográfica: Biblioteca Prof^o Mário Werneck, Escola de Engenharia da UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

***“DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS DE
AFINIDADE PARA A SEPARAÇÃO DE BROMELINA”***

Danielly Cristina Alves Abreu

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos à obtenção do título de **MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA**.

258ª DISSERTAÇÃO APROVADA EM 1º DE ABRIL DE 2019 POR:

Luzia Sergina de Franca Neta

Profª. Dra. Luzia Sergina Franca Neta
CEFET-MG

Érika Cristina Cren

Profª. Dra. Érika Cristina Cren
DEQ/UFMG

Kátia Figueiredo

Profª. Dra. Kátia Cecília de Souza Figueiredo
Orientadora – DEQ/UFMG

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e por ter me conduzido até a conclusão de mais essa etapa.

À minha família pelo apoio incondicional, em especial aos meus queridos pais, Vânia e Mário, que sempre estiveram ao meu lado me encorajando, orando e acreditando que tudo daria certo.

Ao meu namorado e melhor amigo, Thiago Oliveira, pelo incentivo, companheirismo e pelas doses diárias de otimismo.

À minha orientadora Dra. Kátia Figueiredo pelo tempo disponibilizado, pela orientação, paciência e por me mostrar sempre o verdadeiro sentido da pesquisa científica.

Aos colegas de laboratório, em especial ao Bruno e ao Marcelo, pelas conversas, compartilhamento de ideias e desabafos.

Às professoras Sônia Denise, do departamento de Engenharia de Minas e à professora Miriam Amaral do DESA, que gentilmente cederam acesso aos laboratórios e equipamentos, sendo de fundamental importância para a concretização desse trabalho.

Ao professor Paulo Brandão do departamento de Engenharia de Minas e à técnica Isabel pela análise de FTIR.

Aos técnicos de laboratório, Ronald e Dhayannie, que sempre se mostraram muito prestativos e solícitos.

À Escola de Engenharia da UFMG, ao programa de Pós-graduação em Engenharia Química e à CAPES pela concessão da bolsa.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água do mar, mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.” (Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

Existe um grande interesse nos processos de separação e concentração de proteínas, pois as etapas de purificação correspondem a 70-90% dos custos de produção totais. A bromelina é uma enzima que pode ser obtida a partir do abacaxi, incluindo suas partes consideradas como resíduos e apresenta alto valor comercial. Os processos de separação por membranas aparecem como um método atrativo, como é o caso das membranas de afinidade, que combinam alta seletividade com a alta produtividade associada às membranas de filtração. No entanto, apesar dessas vantagens, pouco se tem estudado a respeito da aplicação dessa membrana na separação da bromelina. O objetivo desse trabalho foi produzir membranas de afinidade porosas através da modificação superficial de membrana comercial de policarbonato e produzir membranas de afinidade densa através da modificação superficial de membranas densas de poli (álcool vinílico) (PVA) sintetizadas em laboratório. Ambas foram aplicadas na separação da bromelina e da albumina de soro bovino (BSA), proteína modelo. Para isso, foram investigados os parâmetros para o desenvolvimento dessas membranas, como temperatura de secagem de PVA, concentração de glutaraldeído (GA), temperatura de imobilização de adsorvente (azul de Coomassie brilhante), assim como os processos de adsorção e dessorção. Os resultados de permeabilidade hidráulica e adsorção de BSA deram indícios da modificação superficial, mostrando que a rota proposta apresenta potencial para ser utilizada no desenvolvimento de membranas de afinidade. No caso da BSA, foi possível comprovar que a modificação superficial aumentou em 76% a adsorção dessa proteína na membrana densa, com dessorção de 76%. Na membrana porosa em sistema contínuo, foi possível adsorver 67,71 mg de BSA por grama de membrana. No caso da bromelina, em pH 6,5, obteve-se a adsorção de 61,07 mg de bromelina por grama de membrana porosa e 6 % dela foi dessorvida em membrana densa com aumento expressivo na atividade enzimática específica de 76,7 para 989,1 U/mg.

Palavras-chave: Bromelina. Membrana. Afinidade. Adsorção.

ABSTRACT

There is a great deal of interest in protein separation and concentration processes, as purification steps correspond to 70-90% of total production costs. Bromelain is an enzyme that can be obtained from pineapple, including its parts considered as residues and has high commercial value. The membrane separation processes appears as an attractive method, as is the case of affinity membranes, which combine high selectivity with high productivity associated with filtration membranes. However, despite these advantages, little has been studied regarding the application of this membrane in the separation of bromelain. The objective of this work was to produce porous affinity membranes through the surface modification of commercial polycarbonate membrane and to produce dense affinity membranes by surface modification of dense polyvinyl alcohol (PVA) membranes synthesized in laboratory. Both were applied in the separation of bromelain and bovine serum albumin (BSA), model protein. For this, the parameters for the development of these membranes, such as PVA drying temperature, glutaraldehyde concentration (GA), adsorbent immobilization temperature (Coomassie blue brilliant), as well as the adsorption and desorption processes were investigated. The results of hydraulic permeability and adsorption of BSA gave evidence of surface modification, showing that the proposed route has potential to be used in the development of affinity membranes. In the case of BSA, it was possible to prove that the surface modification increased the adsorption of this protein by 76% in the dense membrane, with 76% desorption. In the porous membrane in a continuous system, it was possible to adsorb 67.71 mg of BSA per gram of membrane. In the case of bromelain at pH 6.5, 61.07 mg of bromelain per gram of porous membrane was obtained and 6% of it was desorbed on a dense membrane with an expressive increase in specific enzyme activity from 76.7 to 989.1 U / mg.

Keywords: Bromelain. Membrane. Affinity. Adsorption.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Participação relativa dos estados brasileiros na produção de abacaxi em 2017.	20
Figura 2- Estrutura tridimensional da bromelina do caule.	22
Figura 3- Estrutura tridimensional da bromelina da fruta.	22
Figura 4- Estrutura molecular do policarbonato.	32
Figura 5- Estrutura molecular do PVA.	33
Figura 6- Fórmula estrutural do glutaraldeído.	34
Figura 7- Estrutura do azul de Coomassie brilhante G-250.	35
Figura 8- Estrutura da BSA.	36
Figura 9- Mecanismo de reação entre o PVA e o GA.	37
Figura 10- Rota de modificação para a membrana porosa de policarbonato.	38
Figura 11- Rota de síntese/ modificação para a membrana densa de PVA.	38
Figura 12- Sistema de filtração em escoamento frontal à membrana.	43
Figura 13- Sistema utilizado para o teste de permeabilidade hidráulica.	46
Figura 14- Espectro de infravermelho das membranas porosas sem modificação e modificadas com PVA em 26°C e a 30°C.	54
Figura 15- Comprimento de onda máximo do corante Azul de brilhante.	56
Figura 16- Membranas produzidas por três temperaturas de imobilização do corante: ambiente, 50°C e 80°C.	57
Figura 17- Imagem da superfície da membrana porosa modificada por microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 15000 vezes.	58
Figura 18- Variação do fluxo com o tempo de operação para a membrana sem modificação, modificada com PVA e GA e modificada com PVA, GA e azul de Coomassie brilhante.	59
Figura 19- Deposição e formação de grupos formados na superfície da membrana porosa de policarbonato.	60
Figura 20- Espectro no infravermelho para as membranas porosas sem modificação e modificada.	61
Figura 21- Membrana densa produzida submetida à modificação pelo GA e pelo azul de Coomassie brilhante.	65
Figura 22- Deposição e formação de grupos formados na superfície da membrana densa de PVA/GA.	66

Figura 23- Imagem da superfície densa modificada por microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 1000 vezes.	67
Figura 24- Ponto de carga zero da membrana densa produzida.	68
Figura 25- Espectro no infravermelho para as membranas densas sem modificação adicional e modificada.	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Principais resultados obtidos para as membranas porosas e densas.....	53
Tabela 2- Resultados para a quantificação da adsorção para a avaliação das concentrações de GA empregadas.	55
Tabela 3- Concentrações residuais do corante azul de Coomassie brilhante na água de lavagem das membranas.	56
Tabela 4- Variação da adsorção de bromelina em função do pH empregado.	62
Tabela 5- Resultados para o teste de adsorção da BSA em sistema contínuo.....	63
Tabela 6- Teste de adsorção de BSA obtidos para os três tipos de membranas densas testadas.	65
Tabela 7- Resultados para o teste de dessorção.....	70
Tabela 8- Resultados para o teste de adsorção e dessorção da bromelina.....	71

LISTA DE SIGLAS

BSA- Albumina de soro bovino

CDU- Unidade de digestão de caseína

Da- Unidade de massa molar, Dalton

FTIR- Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

GA – Glutaraldeído

HSA- Albumina de soro humano

M- Concentração molar

MEV- Microscopia eletrônica de varredura

PC- Policarbonato

PCZ – Ponto de carga zero

PEG- Polietilenoglicol

pH- Potencial hidrogeniônico

pI- Ponto isoelétrico

Pt- Proteína total

PVA- Poli(vinil)álcool

TCA- Ácido tricloroacético

TRIS- Trisamina

LISTA DE SIMBOLOS

Δp	Diferença de pressão	[bar]
J	Fluxo de permeado	[L.m ⁻² .h ⁻¹]
t	Tempo de permeação	[h]
A _m	Área da membrana	[m ²]
L _p	Permeabilidade hidráulica	[L. m ⁻² .h ⁻¹ .bar ⁻¹]
R ²	Coefficiente de correlação	[]
V _p	Volume de permeado	[L]
C _{tirosina}	Concentração de tirosina	[μg. mL ⁻¹]
V _f	Volume total da análise	[mL]
V _a	Volume da amostra	[mL]
t _i	Tempo de incubação	[min]
C _i	Concentração inicial	[mg. mL ⁻¹]
C _f	Concentração final	[mg. mL ⁻¹]
a	Atividade enzimática	[U.mL ⁻¹]
a _s	Atividade enzimática específica	[U.mg ⁻¹]

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 ABACAXI.....	19
3.2 BROMELINA	21
3.2.1 Aplicações da bromelina	23
3.3 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO.....	24
3.4 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS	26
3.4.1 Fluxo de permeado e permeabilidade hidráulica	27
3.4.2 Ultrafiltração.....	28
3.5 MEMBRANAS DE AFINIDADE	30
3.5.1 Modificação superficial de membranas.....	31
3.5.2 Policarbonato	32
3.5.3 PVA.....	33
3.5.4 Glutaraldeído (GA)	34
3.5.5 Azul de Coomassie brilhante	34
3.5.6 BSA (proteína modelo).....	36
3.5.7 Rotas sugeridas	37
4. METODOLOGIA.....	39
4.1 MATERIAIS	39
4.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE BROMELINA PADRÃO	39
4.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE BSA	40
4.4. PREPARO DO REAGENTE DE BRADFORD	40
4.5 DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA TOTAL	40
4.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA BROMELINA.....	41
4.7 MODIFICAÇÃO DAS MEMBRANAS POROSAS	42
4.7.1 Lavagem das membranas	42
4.7.2 Modificação das membranas porosas de policarbonato pelo PVA.....	42

4.7.2.1	Teste para determinar a melhor condição de secagem do PVA na membrana porosa	43
4.7.3	Modificação das membranas porosas de policarbonato pela reticulação do PVA e GA	44
4.7.3.1	Teste para determinar a melhor concentração de GA	44
4.7.4	Imobilização do azul de Coomassie brilhante	44
4.7.4.1	Teste para determinar a melhor temperatura de imobilização do azul de Coomassie brilhante	45
4.7.5	Caracterização das membranas porosas	45
4.7.5.1	Permeabilidade hidráulica	46
4.7.5.2	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	47
4.7.5.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	47
4.7.6	Experimento de adsorção da bromelina em batelada	47
4.7.6.1	Investigação do melhor pH de adsorção da bromelina	47
4.7.7	Teste de adsorção de BSA em sistema contínuo	48
4.8	SÍNTESE E MODIFICAÇÃO DAS MEMBRANAS DENSAS	48
4.8.1	Síntese das membranas densas de PVA	48
4.8.2	Modificação das membranas densas	49
4.8.3	Teste de adsorção do BSA na membrana densa	49
4.8.4	Caracterização das membranas densas	50
4.8.4.1	Ponto de carga zero	50
4.8.4.2	FTIR	51
4.8.4.3	MEV	51
4.8.5	Teste de dessorção da proteína BSA	51
4.8.6	Teste de adsorção e dessorção da bromelina	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO		53
5.1	MEMBRANAS POROSAS	53
5.1.1	Secagem da membrana	53
5.1.2	Concentração de GA	55
5.1.3	Temperatura de imobilização do azul de Coomassie brilhante	55
5.1.4	MEV	57
5.1.5	Permeabilidade hidráulica	58
5.1.6	FTIR	60
5.1.7	pH de adsorção de bromelina	61
5.1.8	Adsorção de BSA em sistema contínuo	63

5.2 DAS MEMBRANAS POROSAS ÀS MEMBRANAS DENSAS	64
5.3 MEMBRANAS DENSAS	65
5.3.1 Teste de adsorção de BSA em membrana densa	65
5.3.2 MEV	67
5.3.3 Ponto de carga zero (PCZ).....	68
5.3.4 FTIR.....	69
5.3.5 Teste de dessorção da BSA da membrana.....	70
5.3.6 Adsorção e dessorção de bromelina	71
6. CONCLUSÕES	73
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	75
APÊNDICE	86
Apêndice A- Curva de calibração para a quantificação de proteína total pelo método de Bradford.....	86
Apêndice B- Curva de calibração para a quantificação da atividade enzimática.....	86

1. INTRODUÇÃO

Existe um grande interesse no uso eficiente de resíduos agroindustriais da indústria de alimentos (SILVESTRE et al., 2012). A indústria do abacaxi, especificamente, é conhecida por gerar quantidade significativa de resíduos sólidos e valores altos como 75-80% têm sido reportados (GIL; MAUPOEY, 2018), uma vez que apenas 25% da fruta pode ser aproveitada como produto comercializável (TAP; MAJID; KHAIRUDIN, 2016).

O Brasil, especialmente, é um dos principais produtores de abacaxi do mundo (HOSSAIN; AKHTAR; ANWAR et al., 2015) com 99% da sua produção destinada ao mercado interno (DOSSA e FUCHS, 2017). No ano de 2017, a estimativa de produção de abacaxis no Brasil foi de 1,7 bilhão de frutos (IBGE, 2017).

Com o aumento da produção de abacaxi, os resíduos dessa fruta, como casca e caule, também aumentam proporcionalmente e a disposição deles representa um problema crescente (KETNAWA; CHAIWUT; RAWDKUEN, 2012). Duas alternativas possíveis para o aproveitamento desse resíduo são a utilização dele como ração animal e disposição no solo, como adubo, no entanto, essas opções subutilizam o potencial que ele tem (GIL; MAUPOEY, 2018; SITI ROCHA et al., 2013).

Os resíduos de abacaxi foram identificados como uma fonte potencial de componentes valiosos, como a enzima bromelina, uma protease (NOR et al., 2015). As proteases dominam aproximadamente 60% do mercado total de enzimas devido às suas diversas aplicações industriais e terapêuticas (WU et al, 2017). A bromelina, particularmente, tem aplicações importantes nas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética e têxtil (NOR et al., 2016; WU et al., 2017).

Apesar do Brasil ser um importante produtor de abacaxi, ele não extrai a bromelina, que é importada pela indústria por valores muito altos, atingindo R\$ 14.000,00, o quilo (INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ, 2016). Na verdade, os processos de extração e purificação de bromelina para uso farmacêutico têm sido estudados no Brasil, mas o pequeno número de pesquisas envolvidas e as restrições relacionadas à viabilidade de escalonamento dos processos têm obrigado a indústria brasileira a importá-la (COELHO; SILVEIRA; TAMBOURGI, 2014). Aliado a isso, vale ressaltar que esses processos de purificação são caros, correspondendo a 70-90% dos custos de produção totais (SOARES et al., 2012).

A purificação da bromelina é, portanto, muito desejável e técnicas efetivas e economicamente viáveis devem ser desenvolvidas para esse fim (NADZIRAH et al., 2013).

Entre esses métodos, a separação por membranas é uma alternativa, pois tem mostrado bons resultados na extração de proteínas em escala laboratorial e industrial (NOVAES et al., 2016). O processo de separação por membranas é vantajoso na separação de enzimas, pois pode ser realizado a temperatura ambiente, é de fácil escalonamento e é economicamente viável (NOR et al., 2016; LIMA; SANTANA; SOUZA, 2009)

A membrana de afinidade, um tipo especial de membrana, tem sido desenvolvida para combinar a seletividade de resinas (adsorção) com a alta produtividade das membranas de filtração (KLEIN, 2000). Elas são produzidas por meio da modificação da superfície da membrana de forma a adicionar grupos químicos que têm afinidade específica com o alvo a ser separado.

Entre os métodos disponíveis para a modificação tem-se o tratamento com plasma e a modificação química obtida pela reação direta de soluções na superfície da membrana (COSTA, 2009; ISHAK et al., 2017), sendo o último mais acessível e menos oneroso.

Neste trabalho, propôs-se uma metodologia para a modificação superficial de uma membrana porosa comercial de policarbonato e a síntese, seguida da modificação superficial de uma membrana densa de PVA, através do método da reação direta na superfície. O objetivo foi o de melhorar o processo de separação da bromelina por meio dessas membranas de afinidade, que associam a adsorção com a filtração. Para tal, inicialmente, foram investigados os parâmetros para a modificação da membrana porosa e as melhores condições obtidas para a membrana porosa foram utilizadas para o preparo da membrana de afinidade densa. As rotas de modificação propostas foram baseadas na reação de reticulação entre o PVA e o GA, reação entre o GA e o corante e a afinidade existente entre o corante azul de Coomassie brilhante e as proteínas. As membranas de afinidade produzidas foram caracterizadas e testes de adsorção e dessorção foram realizados. A adsorção e dessorção da albumina de soro bovino (BSA), que é considerada uma proteína padrão na literatura, também foi estudada nas membranas produzidas. Os testes deste trabalho foram conduzidos com bromelina padrão comercial.

Este trabalho foi o segundo nessa linha e o primeiro do grupo de pesquisa, contando com a parceria do departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA), representado pela Prof.^a Miriam Amaral, e do departamento de Engenharia de Minas, representado pelos professores Paulo Brandão e Sônia Denise. O trabalho anterior a esse, desenvolvido por um grupo de LOP (Laboratório de Operações e Processos) em 2017, comparou a separação da enzima pelo processo de extração aquosa de duas fases e pelo processo por membranas e os autores verificaram que esse último apresentou melhores resultados (SIMÕES et al., 2017). Tendo em vista isso, o presente trabalho buscou o refinamento do processo por membranas por

meio do desenvolvimento de membranas de afinidade, com uma rota de modificação ainda não relatada na literatura.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de membranas de afinidade, porosas e densas, por meio da modificação superficial, para a separação de proteínas, em especial, a bromelina e a BSA. A membrana de afinidade porosa foi preparada pela modificação superficial de uma membrana comercial de policarbonato e a membrana de afinidade densa de PVA foi sintetizada em laboratório, sendo também submetida à modificação superficial.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos são apresentados abaixo:

- Sintetizar dois tipos de membrana de afinidade, uma porosa e uma densa;
- Definir as condições para o desenvolvimento das membranas porosas como, temperatura de secagem do PVA, concentração de GA e temperatura de imobilização do corante azul de Coomassie brilhante (adsorvente) e utilizar as melhores condições obtidas nessa etapa para o desenvolvimento das membranas de afinidade densas;
- Definir a melhor rota de preparo de membrana densa (membrana sem modificação, membrana modificada diretamente pelo azul de Coomassie brilhante e membrana modificada pelo GA e pelo azul de Coomassie brilhante) através do teste de adsorção da BSA na membrana;
- Caracterizar as membranas porosas produzidas utilizando permeabilidade hidráulica, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) com o intuito de verificar o efeito da modificação superficial nessas membranas;
- Caracterizar as membranas densas produzidas utilizando o teste de ponto de carga zero (PZC), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). O PZC foi utilizado para propor uma

metodologia para a dessorção e os dois últimos foram utilizados principalmente para verificar o efeito da modificação superficial;

- Quantificar a adsorção e dessorção das proteínas nas membranas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ABACAXI

O abacaxi (*Ananas comosus*) é uma planta monocotiledônea, herbácea e perene da família Bromeliácea (LIMA et al., 2017). É originário do continente americano, sendo também cultivado na Ásia e na África (RODRIGUES et al., 2016). De clima tropical, apresenta crescimento ótimo e melhor qualidade de frutos na faixa de temperatura de 22 a 32°C e chuvas de 1200 a 1500 mm anuais (CRESTANI et al., 2010).

É uma das frutas comerciais mais importantes no mundo (HOSSAIN; AKHTAR; ANWAR, 2015), a terceira fruta tropical mais popular (CAMPOS et al., 2019), sendo consumida naturalmente ou como ingrediente em produtos como sucos concentrados, geleias, essências e picles (CHAURASIYA; HEBBAR, 2013).

O abacaxi destaca-se pelo seu valor energético; apresenta alta composição de açúcares e valor nutritivo devido a presença de sais minerais (cálcio, fósforo, magnésio, potássio, sódio, cobre e iodo) e de vitaminas (C, A, B₁, B₂ e Niacina) (GRANADA; ZAMBLAZI; MENDONÇA, 2004). Sua composição varia de acordo com a época do ano em que é produzido, variedade e condições climáticas (LIMA et al., 2017), por exemplo, uma espécie que amadureça no inverno tem um maior teor de acidez e menor teor de açúcar, enquanto que o fruto que amadurece no verão, tem um menor teor de acidez e um maior teor de açúcar (RIBEIRO, 2015).

Tailândia, Filipinas, Brasil e a China são os principais produtores de abacaxi do mundo, fornecendo quase 50% da produção total (HOSSAIN; AKHTAR; ANWAR, 2015). Em relação à produção de abacaxi no Brasil, esta está concentrada principalmente na região Norte, Nordeste e Sudeste do país (GUIMARÃES, 2015). No Norte, o destaque é para o estado do Pará e no Sudeste, o estado de Minas Gerais lidera como terceiro produtor do país. O gráfico da Figura 1 apresenta a participação dos principais estados produtores.

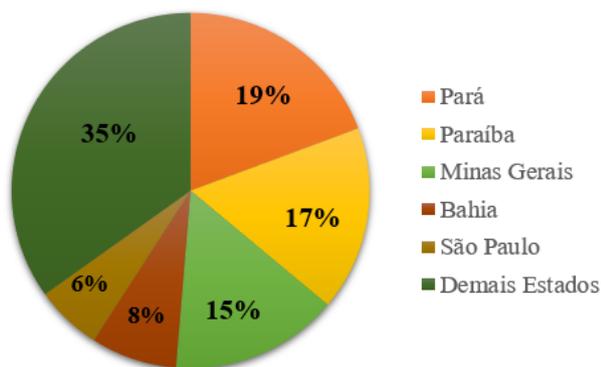


Figura 1- Participação relativa dos estados brasileiros na produção de abacaxi em 2017.
 Fonte: Adaptado de (IBGE/LSPA fevereiro/2017), disponível no relatório da Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais.

A produção brasileira do abacaxi é, em sua maioria, destinada ao mercado interno de frutas secas, sendo menos de 1% do total exportado (REINHARDT et al., 2000). As cultivares mais plantadas no Brasil são a Pérola e a *Smooth Cayenne*, sendo a Pérola considerada insuperável para o consumo ao natural, graças a sua polpa suculenta e saborosa (LIMA et al., 2017).

O abacaxi é um fruto muito apreciado em várias regiões do mundo, constituindo-se em um dos principais produtos da fruticultura nacional, mas apesar da abundância do cultivo dessa fruta no Brasil, o aproveitamento industrial ainda é pequeno frente ao consumo da fruta *in natura*, sendo necessária a busca de alternativas para o seu uso, visando o aproveitamento do excesso de safras, principalmente pela indústria, para a fabricação de produtos não tradicionais (ARAÚJO et al., 2009).

A indústria do abacaxi é conhecida por gerar quantidade significativa de resíduos sólidos, tendo em vista que somente 25% da fruta é aproveitada como produto comercializável (TAP; MAJID; KHAIRUDIN, 2016). Somente o caule da fruta contribui com 20% do total de resíduos gerados pela indústria de processamento do abacaxi (CAMPOS et al., 2019).

Quando estes resíduos são usados como ração animal ou são dispostos no solo, o seu potencial é subutilizado (GIL; MAUPOEY, 2018; SITI ROCHA et al., 2013). Comumente, os agricultores também manipulam esses resíduos por secagem ao sol e queima, o que não é ambientalmente correto (NAKTHONG; WONGSAGONSUP; AMORNSAKCHAI, 2017). Atualmente, o resíduo do abacaxi é visto como uma matéria-prima que pode ser convertida em produtos de maior valor agregado, mas a maioria deles ainda desenvolvidos em escala laboratorial (CAMPOS et al., 2017).

3.2 BROMELINA

Bromelina é uma proteína digestiva que pode ser categorizada como uma protease e as proteases pertencem ao grupo de enzimas que têm a função catalítica de hidrolisarem as ligações peptídicas de proteínas (TAP; MAJID; KHAIRUDIN, 2016). A bromelina é semelhante em função à papaína e à ficina e sua atividade enzimática é dependente do grupo tiol de um resíduo de cisteína no seu sítio ativo (AMID et al., 2011).

Entre as plantas da família *Bromeliaceae*, o abacaxi (*Ananas comosus*), é a fonte mais conhecida da bromelina (SILVESTRE et al., 2012). Essa enzima é naturalmente extraída do abacaxi e pode ser obtida mesmo a partir de suas partes não comestíveis, normalmente consideradas como resíduos na indústria (NOR et al., 2016). Apesar de presente em várias partes do abacaxi, como o caule, a fruta, folhas e casca, a bromelina é produzida em quantidades apreciáveis somente no caule e na fruta. Em comparação com a fruta, a concentração de bromelina no caule é maior, além disso, o caule é mais barato, uma vez que a fruta é consumida (RAMLI et al., 2017).

A bromelina não está presente durante os estágios iniciais do desenvolvimento da fruta; no entanto, seu nível aumenta rapidamente e permanece alto até o amadurecimento. Após o amadurecimento, os níveis diminuem ligeiramente. Esta é uma das vantagens do uso do abacaxi como fonte de proteases em comparação com outras plantas porque é a única fruta que contém concentrações relativamente altas de proteases mesmo no estágio maduro (SILVESTRE et al., 2012).

A bromelina é composta por proteases, que incluem a bromelina do caule e a bromelina da fruta (NADZIRAH et al., 2013). A bromelina do caule (EC 3.4.22.32), mais importante do ponto de vista da aplicação industrial, na medida em que mostra atividade em ampla gama de pH, é a proteinase de cisteína mais estudada em preparações de bromelina derivadas do caule de abacaxi. Já a bromelina da fruta (EC 3.4.22.33) é uma proteinase de glucoproteína presente no suco do abacaxi (CORSO; WALISZEWSKI; WELTI- CHANES, 2012; BERNELA; AHUJA; THAKUR, 2016). As estruturas tridimensionais assim como a sequência de aminoácidos da bromelina do caule e da bromelina da fruta são apresentadas nas Figura 2 e 3, respectivamente.

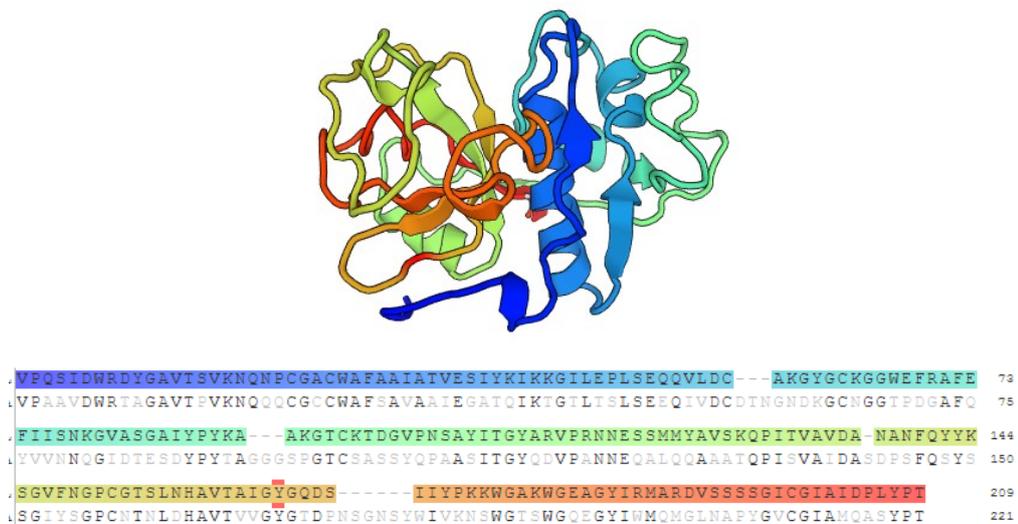


Figura 2- Estrutura tridimensional da bromelina do caule.
Fonte: (Search SWISS-MODEL REPOSITORY, 2017).

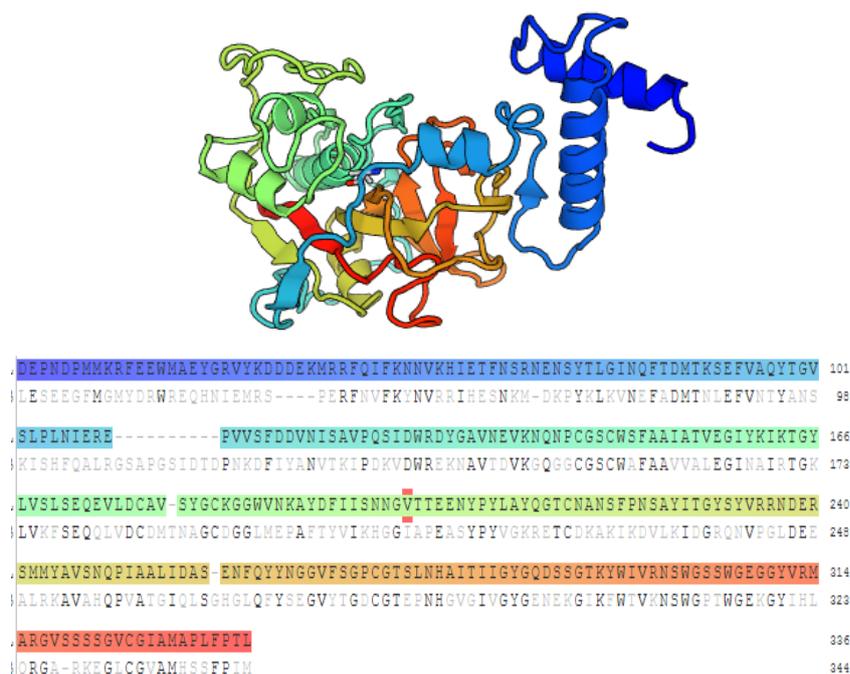


Figura 3- Estrutura tridimensional da bromelina da fruta.
Fonte: (Search SWISS-MODEL REPOSITORY, 2017).

A bromelina do caule é constituída por uma única cadeia polipeptídica com 212 aminoácidos dobrados em dois domínios de estruturas estabilizados por pontes dissulfeto e numerosas ligações de hidrogênio (SOARES et al., 2012). Sua massa molecular média é de 24,5 kDa, com um valor pI (ponto isoelétrico) de 9,55 (ROWAN, 2012) e coeficiente de difusão de $7,77 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (MURACHI; TAKAHASHI, 1969). Por outro lado, a bromelina da fruta apresenta pI em 4,6 (NADZIRAH et al., 2013) e massa molecular média de 31 kDa (SOUZA

et al., 2005). Toda a bromelina comercialmente disponível é derivada do caule (BALA et al., 2013).

A bromelina do caule também é muito estável, o que permite que a enzima mantenha sua atividade biológica a temperaturas entre 40 e 60°C, na qual a maioria das enzimas é desnaturada (COELHO; SILVEIRA; TAMBOURGI, 2014).

Entre o pH 5,5 e 8,0, a atividade enzimática da bromelina é mantida (PAVAN et al., 2012), mas em condições de estresse, como temperatura elevada, presença de solventes orgânicos e químicos, pode ocorrer um decréscimo da atividade (SOARES et al., 2012).

A bromelina comercial é um produto de alto valor agregado e isso se deve aos altos custos dos processos atualmente disponíveis para a sua purificação e obtenção, o que tem levado ao desenvolvimento de várias estratégias de purificação (COSTA, 2014), como extração líquido-líquido, sistemas micelares, precipitação, técnicas cromatográficas e processos por membranas (BALA et al., 2012).

3.2.1 Aplicações da bromelina

A enzima bromelina tem funções úteis para as indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética e têxtil (NOR et al., 2016; WU et al., 2017).

Na indústria alimentícia, a bromelina tem sido utilizada para o amaciamento de carne, clarificação da cerveja, no processo de assamento de pães e como suplemento (KETNAWA; CHAIWUT; RAWDKUEN, 2012; AMID et al., 2011; BALA et al., 2013). Durante o processo de amaciamento, a bromelina quebra o material fibroso presente na carne (COELHO; SILVEIRA; TAMBOURGI, 2014). Na indústria de panificação, a bromelina melhora o relaxamento da massa, permite que ela aumente uniformemente e produza farinha hipoalergênica, apropriada para pacientes alérgicos ao trigo (ARSHAD et al., 2014).

A bromelina também tem sido estudada para aplicações na indústria cosmética e de higiene como ingrediente ativo em dentifrícios e produtos de pele, tratamento de acne, rugas e pele seca (ARSHAD et al., 2014). É usada como ingrediente ativo para fornecer efeitos de *peeling* (BALA et al., 2013) e como agente de limpeza (CHAURASIYA ; HEBBAR, 2013).

Esta enzima é amplamente utilizada na indústria farmacêutica como ativo para o tratamento de doenças inflamatórias, distúrbios intestinais, doenças relacionadas com a coagulação do sangue (NOR et al., 2015), como agente fibrinolítico (CHAURASIYA;

HEBBAR, 2013), tratamento oral para queimaduras de terceiro grau (BERNELA; AHUJA; THAKUR, 2016), aplicação terapêutica de anticorpos (TAP; MAJID; KHAIRUDIN, 2016) e ação mucolítica (COSTA et al., 2014).

Na indústria têxtil, é incorporada ao processamento de couro (WU et al., 2017). Nesse segmento, a bromelina também é utilizada para melhorar a qualidade de tingimento de fibras proteicas (BALA et al., 2013).

Muitas aplicações têm sido estudadas e com o aumento do emprego da bromelina, amplia-se o interesse em determinar métodos viáveis de extração e purificação dessa enzima (COSTA et al., 2014).

3.3 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO

A produção comercial da bromelina consiste em vários processos, tais como extração, purificação e concentração, secagem e embalagem na forma de pó (NOR et al., 2015). Os processos de isolamento e purificação são as etapas que requerem materiais e operações mais caras ou são extremamente laboriosos (AMID et al., 2011). Levando-se em consideração aspectos econômicos e técnicos, as etapas de purificação correspondem a 70-90% dos custos de produção totais (SOARES et al., 2012).

É desejável que os processos de purificação e concentração sejam econômicos, rápidos, de alto rendimento e robustos. Além disso, eles precisam ter potencial para a recuperação contínua do produto, com uma capacidade e seletividade moderadamente altas para a separação desejada (BALA et al., 2012).

O método convencional para a purificação da bromelina envolve uma sequência complexa de clarificação, precipitação com acetona/ amônio e etapas cromatográficas sucessivas, tornando o processo demorado e não ecologicamente correto. A aplicação de outras técnicas de purificação recentes, como troca iônica, extração aquosa de duas fases, cromatografia de afinidade, filtração em gel e sistemas micelares reversos ainda é limitada porque são processos demorados que exibem baixa especificidade. Além disso, alguns desses métodos geralmente exigem a presença de reagentes químicos, solventes orgânicos e temperatura elevada, o que pode levar à desnaturação e alteração conformacional da proteína (XU et al., 2018).

Dentre as abordagens utilizadas para a separação da bromelina será tratado aqui, a cromatografia de troca iônica, precipitação, sistema aquoso de duas fases e os processos por membranas.

Na separação por sistema aquoso de duas fases, tipicamente utilizam-se dois polímeros hidrofílicos, como o PEG (polietilenoglicol) e dextrana ou um polímero e um sal, como o PEG e fosfato de potássio (FERREIRA et al., 2011). Sob condições favoráveis, a proteína alvo então, tende a se particionar na fase superior, que é menos densa, menos polar e menos hidrofílica, por exemplo, na fase PEG, podendo ser removida por centrifugação (ARSHAD et al., 2014).

Em comparação com outros métodos de separação e purificação, o sistema aquoso de duas fases tem vantagens, como baixo custo, facilidade de escalonamento (BABU; RASTOGI; RAGHAVARAO, 2008) e escopo para operação contínua (NADZIRAH et al., 2013), mas em contrapartida, as altas concentrações de sais nos resíduos causam problemas ambientais (SILVA et al., 2017).

A cromatografia por troca iônica envolve a separação dos componentes de uma mistura com base nas taxas nas quais eles são transportados através de uma fase estacionária, por uma fase móvel que pode ser líquida ou gasosa (NOVAES et al., 2016). Nesse caso, a proteína é ligada à fase estacionária por meio de atração eletrostática (NADZIRAH et al., 2013) e isso ocorre porque as proteínas possuem porções químicas ionizáveis que as tornam suscetíveis a essa ligação (LEVISON, 2003).

Embora a cromatografia tenha sido utilizada com sucesso para separação da bromelina do abacaxi, devido sua alta especificidade, algumas limitações restringem seu uso em escala industrial como alto custo da técnica e baixa capacidade de processamento (YIN et al., 2011; COSTA et al., 2014).

No processo de purificação por precipitação, essa é induzida pela adição de um sal, um solvente orgânico, um polímero não-iônico, um metal, ou alterando o pH do meio (NOVAES et al., 2016). Os métodos tradicionais para o isolamento da bromelina envolvem precipitação química usando sulfato de amônio 50%, acetona 80% e etanol 60% (CAMPOS et al., 2017).

Os métodos de separação de proteínas por precipitação são eficientes para remover contaminantes traço (ARSHAD et al., 2014), geram produtos altamente concentrados, são fáceis para escalar (SILVESTRE et al., 2012) e envolvem equipamentos simples (SILVA; SANTOS; FILETI, 2006). Por outro lado, o principal problema desses métodos é o uso de altas concentrações de sais e solventes que, em muitos casos, não podem ser descartados no meio ambiente, o que implica etapas adicionais de recuperação (CAMPOS et al., 2017). Isso também significa etapas adicionais de purificação e recuperação da proteína (DUONG-LY; GABELLI,

2014), como a diálise. Além disso, para evitar a desnaturação da enzima, o processo deve ser realizado em temperaturas baixas (ARSHAD et al., 2014).

Nos processos de separação de proteínas pode ser difícil e dispendioso recuperar seletivamente uma enzima-alvo de um extrato bruto devido à baixa concentração de proteína entre vários contaminantes e a similaridade das propriedades físicas entre as proteínas presentes na mesma solução (SOARES et al., 2012). Na separação de bromelina, por exemplo, existem outros compostos como fosfatases, glucosidases, peroxidases, celulasas, glicoproteínas e carboidratos (SILVESTRE et al., 2012), que precisam ser separados.

Neste cenário de estudo dos processos de separação para a bromelina, novas tecnologias de purificação são exigidas para melhorar os rendimentos enzimáticos globais, reduzir o número de etapas envolvidas na produção de bromelina purificada (WU et al., 2017), assim como produzir enzima ativa (AMID et al., 2011). O estudo sobre métodos de purificação e extração alternativos são, portanto, de grande interesse, visando sempre obter processos economicamente viáveis (LEITE et al., 2012).

3.4 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS

Atualmente, os processos de separação por membranas estão entre as tecnologias mais promissoras para extração, separação e recuperação em diferentes áreas das indústrias modernas (EL ATMANI et al., 2018) e estão se desenvolvendo em alta velocidade (ZHANG et al., 2010).

De modo especial, a micro e a ultrafiltração têm ganhando popularidade nas indústrias de bioseparação (BALA et al., 2012). Em termos de separação de proteínas, a filtração por membrana tem mostrado bons resultados e tem sido amplamente utilizada em laboratório e em processos em escala industrial (NOVAES et al., 2016).

Uma membrana pode ser definida como uma barreira seletiva que permite a passagem de certas moléculas ou íons através da combinação da exclusão por tamanho e do mecanismo de difusão, podendo ser classificada como porosa ou densa (ISHAK et al., 2017). No caso da micro e ultrafiltração, o processo de separação por membranas baseia-se principalmente em diferenças nos tamanhos das partículas (BALA et al., 2012) e a transferência de massa durante a filtração é influenciada pela diferença de pressão aplicada à membrana (NOVAES et al., 2016).

No caso dos processos que empregam membranas densas, a capacidade seletiva depende da afinidade das diferentes espécies com o material da membrana (etapa de natureza termodinâmica) e da difusão das mesmas através do filme polimérico (etapa de natureza cinética) (HABERT et al., 2006).

A bromelina pode ser purificada a partir do extrato de abacaxi usando membrana e essa é considerada uma tecnologia de purificação atrativa em comparação com os outros métodos de processamento. Isso porque oferece grandes vantagens como alto rendimento do produto, fácil escalonamento, processo ambientalmente correto e econômico (NOR et al., 2016). Além disso, são processos fáceis de operar, seletivos, podem ser aplicados na separação de termoláveis (LIMA; SANTANA; SOUZA, 2009) e produzem menor quantidade de resíduos durante a purificação (NOR et al., 2015). Um estudo sobre a redução do custo de produção de bromelina através da introdução de processos de membrana reportou uma redução substancial de 6,5 a 8,5 vezes se comparado à bromelina produzida por extração líquido-líquido. Embora algumas limitações relacionadas ao uso de membranas, como declínio do fluxo e incrustação, têm sido reportadas especialmente quando o processo é utilizado na separação de proteínas, questões como essas podem ser superadas com os avanços da tecnologia por membranas (NOR et al., 2017a).

3.4.1 Fluxo de permeado e permeabilidade hidráulica

O fluxo é definido como o volume de permeado que atravessa a membrana por unidade de tempo e área de permeação, conforme mostrado na Equação 1.

$$J = \frac{V_p}{tA_m} \quad (1)$$

Onde:

J é fluxo permeado;

V_p é o volume permeado;

t é o tempo de permeação;

A_m é a área da membrana.

Para membranas porosas, como as de micro e ultrafiltração, a força motriz é a diferença de pressão entre a alimentação e o permeado e o fluxo pode ser determinado pela pressão e pela resistência ao transporte. Uma descrição fenomenológica, adaptada do modelo das resistências, comum para descrever o fluxo através de um meio poroso é descrito pela Equação 2 (DIEL, 2010).

$$J = \frac{\Delta p}{\mu R_T} \quad (2)$$

Onde:

Δp é a diferença de pressão através da membrana;

μ é a viscosidade dinâmica do fluido;

R_T é a resistência total ao transporte.

Essa constante de proporcionalidade entre o fluxo e a pressão, quando o fluido é exclusivamente água, é chamada de permeabilidade hidráulica (L_p), conforme mostrado na Equação 3.

$$J = L_p \Delta p \quad (3)$$

3.4.2 Ultrafiltração

A ultrafiltração é um dos métodos para a concentração de proteínas e tem sido amplamente utilizado em escalas laboratoriais e comerciais. As membranas de ultrafiltração têm massa molar de corte variando de 3 a 100 kDa (RAMLI et al., 2017). Massa molar de corte é tipicamente definida como a massa molar do soluto que tem uma rejeição de 90% (POLYAKOV; ZYDNEY, 2013).

O processo por membrana para a purificação da bromelina requer condições amenas de processamento, como 0,5 a 4 bar, pH 4 a 8,5, sem compostos corrosivos (NOR et al., 2017a).

Uma desvantagem da ultrafiltração é o fenômeno de incrustação (ARSHAD et al., 2014). Especialmente no extrato de abacaxi, a existência de açúcares complexos, como os polissacarídeos, pode afetar a eficiência do processo de purificação, uma vez que esses polímeros tendem a aglomerarem-se com proteínas em diferentes condições, tais como pH, temperatura e tensão de cisalhamento. Essas interações podem levar a uma incrustação severa e conseqüentemente ao declínio substancial do fluxo permeado (NOR et al., 2015). Essa é uma das razões pelas quais as membranas de ultrafiltração são frequentemente operadas por filtração tangencial de forma a melhorar as condições hidrodinâmicas e manter a separação em fluxo contínuo (SAEKI; MINAMI; MATSUYAMA, 2017). De acordo com Nor et al. (2017a), essas limitações relacionadas ao declínio do fluxo e incrustação podem ser superadas com a avanço da tecnologia por membranas.

O processo de separação da bromelina por membranas, seja por processo integrado a outras técnicas ou com sistemas formados por mais de uma membrana, tem sido objeto de estudo e os resultados de alguns desses trabalhos são apresentados a seguir.

Doko et al. (1991) purificaram a bromelina do suco de abacaxi usando um processo integrado formado por dois estágios de membrana (microfiltração-8 µm e ultrafiltração com massa molar de corte de 100 kDa), seguido de extração com sulfato de amônio, ultracentrifugação e liofilização. Eles reportaram um produto com 98% de proteína total e um fator de concentração de 2,8.

Lopes et al. (2009) também recuperaram a bromelina extraída do suco de abacaxi, usando um módulo de membrana plana (membrana de microfiltração de poli(fluoreto de vinilideno) com poro de 0,1 µm) seguido de um kit Millipore (ultrafiltração 10 kDa, 4 ° C, 7000 rpm, 20 minutos). Eles filtraram o suco através de algodão e depois estudaram a influência do pH (7,0 e 7,5) e da pressão (0,05 e 0,15 bar) na recuperação da atividade em um processo de microfiltração tangencial. O pH 7,0 ou 7,5 na pressão de 0,05 bar foram melhores para a recuperação da atividade da enzima bromelina (aproximadamente 90%). Além disso, a ultrafiltração produziu um extrato de bromelina 10 vezes mais concentrado.

Hebbar, Sumana e Hemavathi (2012) estudaram a purificação de bromelina a partir de extrato aquoso do caule de abacaxi empregando um processo integrado de sistema micelar reverso e ultrafiltração (membrana de acetato de celulose 5 kDa, 1 bar). Eles relataram uma recuperação da atividade de 95,8% e fator de purificação de 8, 9.

Nor et al. (2015) estudaram as propriedades químicas e físicas de uma mistura de extrato bruto de abacaxi. Eles relataram que, entre os extratos, as partes da fruta e coroa apresentaram a maior atividade enzimática específica de 561 e 520 CDU/mg de proteína, respectivamente. O

estudo deles também sugeriu que o processo de separação por membranas deve ser realizado a uma temperatura de 20-25°C, em pH 7.

Nor et al. (2016) empregaram um sistema com membranas cerâmicas de ultrafiltração em dois estágios com fluxo tangencial para a separação da bromelina. A primeira membrana utilizada foi de massa molar de corte de 75 kDa, seguida de uma segunda de 10 kDa. Eles relataram uma recuperação da bromelina na primeira etapa de 96,8% com um fator de purificação de 2,5 vezes no concentrado (estágio 2). O fluxo mais elevado foi obtido quando o pH da alimentação foi ajustado perto do pI da membrana (pH 7,0).

Nor et al. (2017b) manipularam a pressão e a velocidade do fluxo tangencial em um sistema de ultrafiltração em duas etapas usando membranas cerâmicas para separar a bromelina do extrato de abacaxi contendo a mesma proporção de partes da fruta do estudo anterior. O primeiro estágio também foi composto por uma membrana de 75 kDa seguido por uma membrana de 10 kDa. Eles descobriram que os mecanismos de incrustação presentes em ambos os estágios de ultrafiltração foram afetados pela pressão, a velocidade do fluxo tangencial e o tamanho dos poros da membrana, e, em geral, a formação de torta controlou o processo na fase 1 e o bloqueio dos poros e a formação de torta controlaram o estágio 2. A melhor recuperação no estágio 1 foi de 96,1% quando operado a 2,0 bar e 0,30 m/s. A maior pureza enzimática (fator de purificação de 1,7) foi encontrada no estágio 2 quando operado em 1,0 bar e 0,16 m/s.

3.5 MEMBRANAS DE AFINIDADE

Nas últimas décadas, as membranas de afinidade têm sido amplamente aplicadas na purificação de proteínas, devido à baixa queda de pressão, rápida taxa de ligação, alta produtividade e fácil aumento de escala (HE; WANG; WEI, 2016). Elas foram desenvolvidas principalmente para superar os problemas de limitada especificidade experimentados com membranas que operam puramente em um mecanismo por exclusão por tamanho, seja no campo de ultrafiltração ou microfiltração (WANG et al., 2017).

A ideia é que as membranas de afinidade possam combinar a excepcional seletividade das resinas de afinidade com a alta produtividade associada às membranas de filtração (KLEIN, 2000).

Basicamente, a superfície de uma membrana é modificada quimicamente com ligantes para conferir seletividade de separação biospecífica em nível molecular, de modo que esta

membrana capte seletivamente moléculas alvo com base na interação específica entre os ligantes e as moléculas alvo (HONJO et al., 2013), através do processo de adsorção. O processo de adsorção pode ser definido como a ligação de um soluto dissolvido a um adsorvente sólido. Atualmente, o uso de adsorção com uma grande variedade de adsorventes está se tornando mais comum na preparação de bromelina (ARSHAD et al., 2014). O sistema de adsorção por afinidade parece ser mais adequado para a biosseparação devido a sua alta seletividade (OGATA et al., 2013).

As vantagens das operações com membrana de afinidade sobre a purificação tradicional, usando membranas convencionais, são: melhor remoção de macromoléculas, microorganismos e compostos que participam de incrustação e qualidade melhorada do produto final (ZHANG et al., 2010), mas o controle do grau e uniformidade de modificação é um desafio (HONJO et al., 2013).

A principal referência relacionada ao uso de uma membrana de afinidade para separar a bromelina é o trabalho de Zhang et al. (2010). Estes autores prepararam uma membrana de afinidade modificada quimicamente com quitosana de forma a produzir uma bicamada compósita que, por sua vez, foi unida covalentemente ao azul de Cibacron, que tem afinidade pela bromelina. Esse adsorvente mostrou alta capacidade de adsorção de bromelina (161,6 mg/g). Os dados de equilíbrio experimental desse trabalho apontaram o modelo de Freundlich como melhor ajuste. Eles também recuperaram a membrana e a utilizaram por três vezes sem perder a capacidade de adsorção. Uma das grandes críticas relacionadas a esse trabalho é que os autores não avaliaram a atividade enzimática da bromelina antes e após o processo de adsorção.

3.5.1 Modificação superficial de membranas

O interesse pelas técnicas de modificação superficial é justificado pelo fato da alteração permitir controlar e/ou melhorar as características superficiais de materiais, tornando-os mais eficientes e /ou adequados a várias aplicações (CARVALHO et al., 2009). Várias técnicas têm sido empregadas para esse fim e elas vão desde uma simples adsorção física até a formação de ligações químicas, podendo-se citar, o tratamento com plasma e a modificação química obtida pela reação química direta de certas soluções na superfície da membrana (COSTA, 2009; ISHAK et al., 2017).

A técnica de plasma a baixa pressão e temperatura é bem aceita pelo fato de atingir apenas a camada superficial, devido ao baixo alcance de sua penetração, em torno de alguns nanômetros (MACÊDO et al., 2012), além de ser muito eficiente. No entanto, se apresenta como uma técnica cara (TU et al., 2005). Nessa técnica, o plasma é produzido quando um gás a baixa pressão é submetido a um campo elétrico, resultando em uma atmosfera cheia de íons, átomos, moléculas e radicais livres (MACÊDO et al., 2012).

O segundo método, da reação direta na superfície, pode ser realizado através da adição de grupos funcionais que interagem com o adsorvato (MARQUES, 2009) e é usado principalmente para reduzir a incrustação ou aumentar a seletividade da membrana (ISHAK et al., 2017). É uma técnica mais acessível e menos onerosa, sendo esse o motivo pelo qual foi o método empregado neste trabalho.

3.5.2 Policarbonato

Policarbonato é um material polimérico termoplástico contendo grupos carbonato ($-O-(C=O)-O-$) (PARK; KIM, 2017). É considerado como um bom candidato para a fabricação de membranas devido as suas excelentes propriedades físicas, boa tenacidade e baixo custo (DELAVAR; BAKERI; HOSSEINI, 2017). Além disso, é biocompatível e está amplamente disponível comercialmente (BAUMANN et al., 2013). Sua fórmula molecular é apresentada na Figura 4.

As membranas de policarbonato são usualmente preparadas pela técnica de gravação (BEHBOUDI; JAFARZADEH; YEGANI, 2017) e devido a isso são conhecidas por apresentarem poros cilíndricos. Sua morfologia de poros pode ser considerada próxima da ideal, no que diz respeito à disponibilidade de poros uniformes e retos (ÇÖKELILER, 2013).

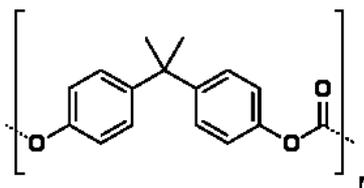


Figura 4- Estrutura molecular do policarbonato.

3.5.3 PVA

O PVA é um polímero semicristalino sintético (NGADIMAN et al., 2015) obtido pela primeira vez em 1924, por Herrman e Haehnel, pela hidrólise do poli(acetato de vinila) (ARANHA; LUCAS, 2001). Nesse processo, basicamente, o monômero acetato de vinila é polimerizado a poli (acetato de vinila) e os grupos acetato desse polímero são hidrolisados para formar o PVA (THONG; TEO; NG, 2016), cuja estrutura é representada na Figura 5.

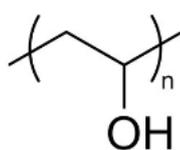


Figura 5- Estrutura molecular do PVA
Fonte: MONTEIRO, 2017.

Está disponível em classes altamente hidrolisadas (geralmente com um grau de hidrólise maior que 98,5%) e parcialmente hidrolisadas (com graus de hidrólise variando de 80 a 98,5%). O grau de hidrólise afeta suas propriedades químicas, solubilidade e cristalização (MONTEIRO, 2017).

O PVA é um material amplamente utilizado para fabricar e modificar as superfícies de membranas devido a sua facilidade em formar filmes, alta hidrofiliçidade, excelentes propriedades químicas, estabilidade térmica, biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixo custo (LI et al., 2015; HASSAN et al., 2018). É dos poucos polímeros semicristalinos solúveis em água com boas características interfaciais e mecânicas (ARANHA e LUCAS, 2001).

Por ser muito solúvel em água, deve passar por algum grau de reticulação durante a sua transformação em membrana (ZHANG et al., 2008). Isso é conseguido facilmente em solução pelo fato de o PVA possuir muitos grupos hidroxilas que reagem com agentes bifuncionais, tais como, dialdeídos e diácidos (CHEN; CHEN, 1996).

Quando a membrana é reticulada com um agente químico, à medida que a densidade de reticulação aumenta, a estrutura da rede da membrana se torna mais compacta, reduzindo a mobilidade das cadeias, o volume livre e o grau de inchamento das membranas (COSTA, 2009).

3.5.4 Glutaraldeído (GA)

O GA, um aldeído linear bifuncional com cinco carbonos, é um líquido oleoso solúvel em todas as proporções em água e álcool, bem como em solventes orgânicos (MIGNEAULT et al., 2004).

Tem sido amplamente utilizado em várias aplicações comerciais devido seu baixo custo e alta reatividade (MEHTA; JOSHI; RAVAL, 2018). Tem capacidade eficiente de reagir com grupos hidroxila (SUN; SHEN; CAO, 2016), além de reticular aminas, amidas e grupos tiol de proteínas (YAMIN et al., 2018).

Comercialmente, pode ser encontrado na forma de soluções aquosas com pH ligeiramente ácido, contendo geralmente 25% ou 50% em massa de glutaraldeído (NOGUEIRA, 2012).

O GA ganhou crescente atenção como um agente de reticulação de PVA devido à ausência de tratamento térmico necessário para conduzir a reação (FIGUEIREDO; ALVES; BORGES, 2008). Sua fórmula estrutural é apresentada na Figura 6.

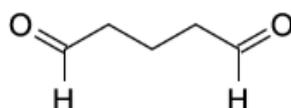


Figura 6- Fórmula estrutural do glutaraldeído.
Fonte (NIEHUES, 2015).

3.5.5 Azul de Coomassie brilhante

Os ligantes corantes são comercialmente disponíveis, geralmente são baratos e apresentam alta seletividade para a separação de enzimas (KONOVALOVA et al., 2016). Além disso, podem ser facilmente imobilizados, especialmente em matrizes contendo grupos hidroxila (LIN et al., 2017).

Esses ligantes interagem com biomoléculas como resultado da combinação de ligações eletrostáticas, hidrofóbicas e de hidrogênio (KONOVALOVA et al., 2016).

Existem duas classificações para o corante azul de Coomassie brilhante: G250 e R250 e o que diferencia uma estrutura da outra são apenas dois grupos metil a mais no G250. Ambos desempenham um papel crucial na análise de proteínas. O R250 é o mais sensível dos dois e tem sido comumente usado para corar proteínas em géis de poliacrilamida, mas o G250 pode se ligar às proteínas de forma mais rápida (CAO; ZHAO; XIONG, 2016). A estrutura molecular do G250, que foi o corante (adsorvente) utilizado nesse trabalho, é apresentada na Figura 7.

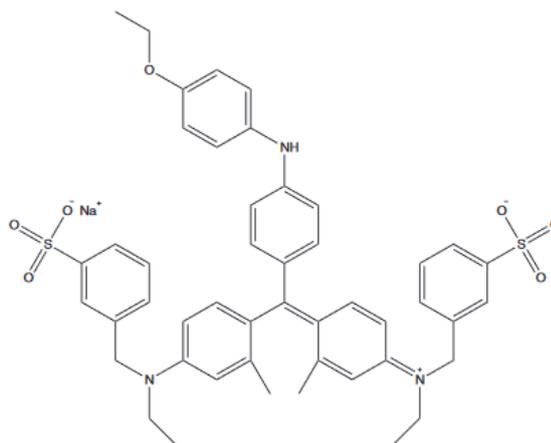


Figura 7- Estrutura do azul de Coomassie brilhante G-250.

Fonte: (CARLSSON; KITTS; AKERMAN, 2012).

O azul de Coomassie brilhante G-250 é um composto de trifenilmetano dissulfonado e existe em três espécies iônicas: forma catiônica (vermelha), forma neutra (verde) e forma aniônica (azul) (RAGHUPATHY; OOMMEN; RAMACHANDRAN, 2014). A forma aniônica se liga às proteínas principalmente através de interações eletrostáticas entre os grupos sulfonados do corante e as cadeias laterais de arginina, lisina e histidina da proteína (WEI; LI; TONG, 1997). A ligação das formas neutras do corante às proteínas ocorre por meio de interações tanto hidrofóbicas quanto eletrostáticas e os grupos sulfônicos das formas catiônicas do corante impedem que elas se liguem às proteínas por força iônica (RAGHUPATHY; OOMMEN; RAMACHANDRAN, 2014).

3.5.6 BSA (proteína modelo)

A albumina de soro bovino (BSA) consiste em uma cadeia polipeptídica única contendo 583 aminoácidos (YUAN et al., 2019) com dezessete ligações dissulfídicas intramoleculares (ELPÍDIO, 2016) e uma cisteína livre residual (AKRAM et al., 2019).

É uma importante proteína de transporte nos sistemas circulatórios de todos os vertebrados (YUAN et al., 2019), sendo a mais abundante no sangue. Sua principal função é a regulação da pressão osmótica coloidal (BAGOJI et al., 2019).

Em geral, é usada como proteína padrão pelo fato de sua estrutura ser simples, por ser de baixo custo, quando comparada à outras proteínas ativas de alta massa molar, e por ser facilmente purificada (THIVYA; WILSON, 2019; NOSRATI et al., 2018).

Apresenta massa molecular igual a 66,5 kDa, é altamente solúvel em água (KOH et al., 2019), devido a presença de aminoácidos muito ionizáveis (AKRAM et al., 2019), tem tamanho de 11,6 x 2,7 x 2,7 nm (VARNIER et al., 2018) e seu ponto isoelétrico é 4,9 (ELPÍDIO, 2016).

Sua estrutura em 3D, apresentada na Figura 8, é muito similar à HSA (Albumina de soro humano) com 76% da sequência idêntica (BAGOJI et al., 2019).

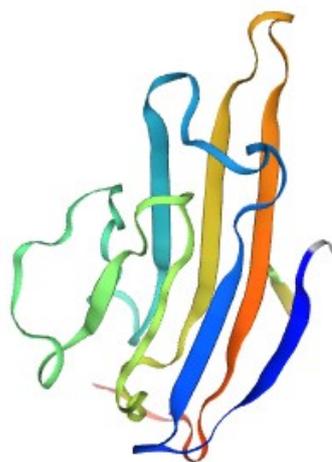


Figura 8- Estrutura da BSA.
Fonte: (Search SWISS-MODEL REPOSITORY, 2017).

3.5.7 Rotas sugeridas

Foram investigadas duas rotas diferentes de preparo de membranas de afinidade, uma com membrana porosa comercial e outra com membrana densa sintetizada no laboratório, ambas com aplicações distintas. A membrana porosa foi modificada visando no seu uso como uma membrana de afinidade clássica e a membrana densa, além de servir como prova de conceito neste trabalho, foi sintetizada prevendo seu uso como uma membrana de diálise específica.

As duas rotas sugeridas foram baseadas na reação de reticulação entre o PVA e o GA, reação entre o GA e o corante e a afinidade existente entre o corante azul de Coomassie brilhante e as proteínas. No caso da membrana porosa de policarbonato, a primeira etapa consistiu no aumento da hidrofiliicidade da superfície da membrana por meio da impregnação de PVA, seguida da sua reação com o GA por uma reação de reticulação. Essa reação é realizada através da adição nucleofílica de um grupo hidroxila ao grupo carbonila para formar ligações de hemiacetal (LIU et al., 2012), conforme pode ser visualizado na Figura 9.

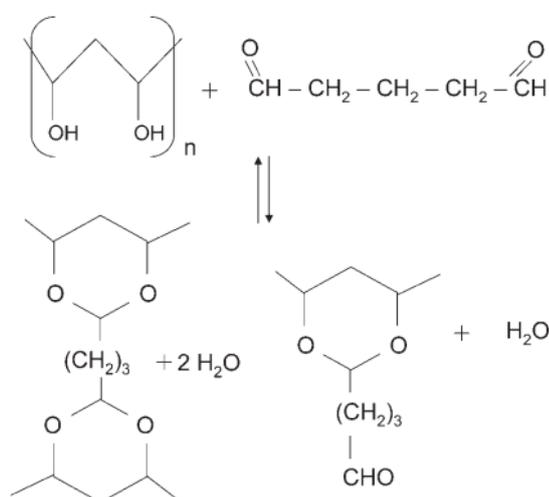


Figura 9- Mecanismo de reação entre o PVA e o GA
 Fonte: (FIGUEIREDO; ALVES; BORGES, 2008).

A etapa posterior consistiu na imobilização do corante por meio da reação entre o grupo amina do corante e o grupo carbonílico do GA. O mecanismo dessa reação envolve o ataque nucleofílico da amina na função carbonílica, com formação de iminas ou enaminas. Costuma-se empregar a catálise ácida nessa reação para aumentar a velocidade da reação, pois assim, ocorre a protonação do oxigênio carbonílico, tornando-o mais suscetível ao ataque nucleofílico

(REIS, 2012). Essa ligação covalente entre o grupo amino e o grupo do aldeído terminal do glutaraldeído é irreversível e resiste a pH extremos e temperatura (NOGUEIRA, 2012).

Por último, tem-se a interação entre o azul de Coomassie brilhante e as proteínas, podendo ocorrer entre as formas aniônica, neutra e catiônica do corante, sendo que a forma iônica interage principalmente com os aminoácidos residuais aromáticos e básicos das proteínas (CAO; ZHAO; XIONG, 2016).

No caso da membrana densa de PVA, essa foi inicialmente produzida em laboratório por meio da reticulação com GA, segundo a mesma reação mostrada na Figura 9 e essa membrana foi submetida aos mesmos processos e reações de modificação que a membrana porosa. Um diagrama de blocos resumindo o processo de modificação em cada tipo de membrana é apresentado nas Figuras 10 e 11.

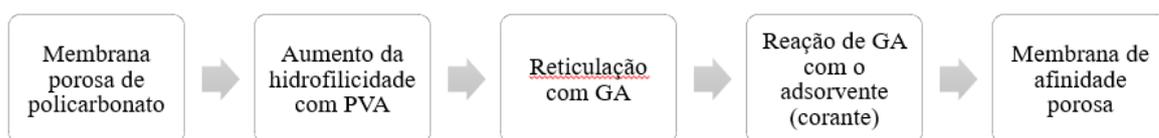


Figura 10- Rota de modificação para a membrana porosa de policarbonato.

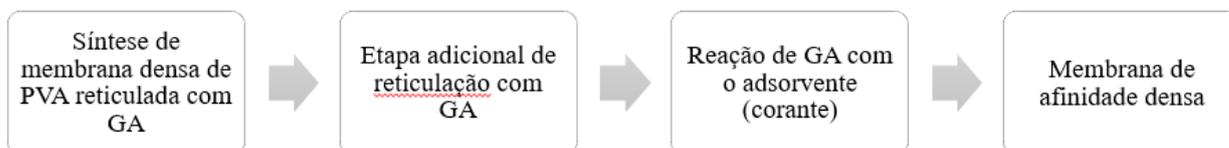


Figura 11- Rota de síntese/ modificação para a membrana densa de PVA.

A única referência conhecida de utilização de membranas de afinidade para a separação da bromelina e que tem uma abordagem semelhante ao que é proposto neste trabalho é o trabalho de Zhang et al. (2010). No entanto, a rota sugerida por esses autores é diferente e os métodos e reagentes indicados por eles são mais caros e onerosos.

4. METODOLOGIA

Dois caminhos são propostos para o desenvolvimento de membranas de afinidade e devido a isso a metodologia está dividida em três partes. No início, são descritos os materiais, procedimentos e técnicas gerais utilizados e em seguida são descritas as metodologias específicas referentes a cada tipo de membrana.

4.1 MATERIAIS

Os materiais utilizados foram: membrana de microfiltração de policarbonato Whatman® com diâmetro de poros de 0,32-0,40 µm; PVA, fornecido pela Sigma-Aldrich® 99% hidrolisado; GA, fornecido pela Anidrol® 50%; azul de Coomassie brilhante G (Cl. 42655), fornecido pela Neon®; bromelina padrão (EC3.4.22.32) e albumina de soro bovino (BSA) ≥ 98%, fornecidas pela Sigma-Aldrich; caseína pura, cloridrato de L-cisteína (anidra) P.A e L-tirosina P.A, fornecidas pela Synth®; ácido tricloroacético (TCA) P.A, fornecido pela Neon®; etanol 95%; ácido fosfórico 85%; fosfato de potássio monobásico Sigma-Aldrich ≥ 99% e fosfato de potássio dibásico P.A Vetec 98%. Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico e utilizados sem purificação adicional.

4.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE BROMELINA PADRÃO

As soluções de bromelina padrão foram preparadas pela dissolução da bromelina em pó em tampão fosfato 0,2 mol/L adequado, que variou dependendo do experimento: pH 6,5; 7,0 ou 7,5 e essas foram submetidas ao banho de ultrassom por 1 hora e meia para a completa dispersão da proteína. As concentrações utilizadas foram 1 e 2 mg/mL.

4.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE BSA

As soluções de BSA foram preparadas pela dissolução da BSA em pó em tampão fosfato pH 7,0, 0,2 mol/L e essas foram submetidas ao banho de ultrassom por 1 hora para a completa dissolução da proteína. As concentrações utilizadas foram: 0,06; 0,13 e 1 mg/mL.

4.4. PREPARO DO REAGENTE DE BRADFORD

Para o preparo deste reagente, dissolveram-se 100 mg de azul de Coomassie brilhante G em 50 mL de etanol 95% e 100 mL de ácido fosfórico 85%. Posteriormente, completou-se o volume com água destilada em balão volumétrico de 1 L e filtrou-se a solução com papel de filtro quantitativo faixa azul com poros de 8 μ m.

4.5 DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA TOTAL

A determinação da proteína total foi realizada pelo método de Bradford, frequentemente utilizado na literatura (LOPES et al., 2009; LIMA; SANTANA; SOUZA, 2009). Nesse método, amostras com concentrações de proteína desconhecidas são misturadas com reagente de Bradford numa proporção volumétrica de 1:10. O corante reage com proteínas gerando um complexo que tem absorvância máxima em 600 nm. Uma curva de calibração com proteína padrão (BSA) é construída a partir da leitura de absorção das soluções neste comprimento de onda e a correlação desta grandeza com a concentração permite quantificar a proteína total.

4.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA BROMELINA

Esta propriedade fundamenta-se na determinação da atividade da bromelina em função da hidrólise da caseína. Basicamente, uma solução de caseína 0,5% (m/v) preparada em tampão TRIS-HCl 0,05 mol/L, pH 9,0, é colocada em contato com o extrato enzimático, juntamente com a solução de ativadores (cloridrato de L-cisteína 10^{-2} mol/L e EDTA dissódico 4×10^{-3} mol/L), em condições controladas: temperatura de 37°C por 30 minutos. Após este período, a reação é interrompida pelo uso de ácido tricloroacético 10% (m/v) e o conteúdo é submetido à centrifugação (30 minutos, 7000 rpm). O sobrenadante, contendo a tirosina, produto da hidrólise da caseína, é lido em espectrofotômetro UV-visível a 275 nm. Uma curva de calibração para a tirosina é feita previamente com concentrações variando de 0 a 100 µg/mL. As quantidades adicionadas para a digestão são: 1,5 mL de caseína + 0,750 mL do extrato enzimático + 0,150 mL de ativadores. Para o branco, as quantidades são dobradas, sendo 3 mL de caseína, 0,300 mL de ativadores e 1,5 mL de água ao invés do extrato enzimático. O valor do branco deve ser descontado na absorbância das amostras.

A atividade proteolítica em U/mL é calculada pela Equação 4.

$$a = \frac{C_{\text{Tirosina}} V_f}{V_a t_i} \quad (4)$$

Onde:

a= Atividade enzimática em U/mL

C_{tirosina} = Valor obtido a partir da absorbância da amostra;

V_f = Volume total da análise (em mL). Neste caso, igual a 3,75mL (os ativadores não contam);

V_a = Volume da amostra (em mL) de extrato enzimático. Neste caso, igual a 0,750 mL;

t_i = tempo (minutos) de incubação. Neste caso, igual a 30 min.

A unidade de atividade enzimática é expressa em $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1} \text{min}^{-1}$ e é definida como a quantidade de enzima que produz o equivalente a 1 µg de tirosina por minuto em pH 9,0 e 37 °C, a 275 nm.

A atividade específica (U/mg de proteína) é calculada pela Equação 5.

$$a_s = \frac{a}{Pt} \quad (5)$$

Onde:

a_s = Atividade enzimática específica em U/mg de proteína;

Pt = Proteína total, em mg/mL do extrato enzimático.

4.7 MODIFICAÇÃO DAS MEMBRANAS POROSAS

4.7.1 Lavagem das membranas

Antes do processo de modificação, todas as membranas foram lavadas com água destilada para remover resíduos de glicerina. Esse procedimento foi realizado em um intervalo de tempo de 3 horas trocando-se a água destilada a cada 30 minutos. As membranas foram armazenadas em temperatura ambiente (26°C).

4.7.2 Modificação das membranas porosas de policarbonato pelo PVA

A solução de PVA 2% m/m, utilizada para o primeiro passo de modificação superficial da membrana, foi preparada em balão de fundo redondo em sistema de agitação e condensação durante 1 hora com temperatura média de 95°C. A escolha dessa concentração foi baseada no trabalho de Figueiredo, Alves e Borges (2008), que utilizou uma concentração de 4% m/m. No presente trabalho, optou-se por uma concentração menor para que a solução de PVA apresentasse menor viscosidade, de forma que fosse possível controlar melhor a espessura da camada depositada.

A adição de PVA à membrana de PC foi realizada através da permeação de 100 mL desta solução em sistema com escoamento frontal usando bomba a vácuo, conforme montagem

apresentada na Figura 12. Após a permeação, as membranas foram secas em temperatura ambiente (26°C) por 48 horas, em um sistema onde a taxa de evaporação foi controlada por meio da diminuição da área exposta para secagem. O processo de secagem foi interrompido fechando-se completamente o recipiente contendo a membrana, com papel alumínio.

O objetivo primordial desta etapa foi o de aumentar a hidrofiliicidade da superfície da membrana e torna-la suscetível à reação de reticulação com o GA.



Figura 12- Sistema de filtração em escoamento frontal à membrana.

4.7.2.1 Teste para determinar a melhor condição de secagem do PVA na membrana porosa

Para avaliar a melhor condição de secagem da membrana, foram testadas preliminarmente duas condições, a primeira foi em uma condição mais branda, temperatura ambiente (26°C), por 48 horas. A segunda foi uma secagem a 30°C por 1 hora. Um teste preliminar feito a 95°C por 1 hora mostrou que temperaturas altas poderiam danificar a membrana, mesmo sendo abaixo da temperatura de transição vítrea do policarbonato que é 150°C (ANGELINI, 1999).

As condições de secagem foram avaliadas pelos espectros de infravermelho dessas membranas.

4.7.3 Modificação das membranas porosas de policarbonato pela reticulação do PVA e GA

A adição de GA ($1,96 \times 10^{-5}$ mol. mL⁻¹) à membrana, como segunda etapa de modificação, foi feita também pela permeação de 100 mL dessa solução em sistema com escoamento frontal, conforme apresentado na Figura 12. Após permeação, as membranas foram secas a temperatura ambiente (aproximadamente 26°C) por 48 horas em um sistema onde a taxa de evaporação foi controlada pela diminuição da área exposta de secagem. O processo de secagem foi interrompido fechando-se completamente o recipiente contendo a mesma com papel alumínio.

4.7.3.1 Teste para determinar a melhor concentração de GA

A primeira concentração de GA testada ($1,96 \times 10^{-5}$ mol. mL⁻¹) foi baseada na razão molar entre GA e PVA ($0,044$ mol.mol⁻¹) indicada no trabalho de Figueiredo, Alves e Borges, (2008). De acordo com estes autores, esta razão foi a que resultou em maior densidade de reticulação.

Nesse trabalho, concentrações 10 e 100 vezes superiores a essa razão inicial foram testadas. O impacto da variação da concentração de GA no preparo da membrana foi observado por meio de teste de adsorção de BSA na membrana. Para tal, a membrana modificada foi submersa em 100 mL de solução de BSA 1 mg/mL preparada em tampão fosfato pH 7,0; 0,2 mol/L e essa solução foi agitada no equipamento *shaker* nas seguintes condições operacionais: 37°C, 160 rpm, por 3 horas.

4.7.4 Imobilização do azul de Coomassie brilhante

Para a imobilização do azul de Coomassie brilhante, as membranas foram imersas em 100 mL da solução do corante (10 mg/mL) preparada em tampão pH 5,0 de acetato 0,05 mol/L por 24 horas. Esse procedimento de imersão no corante é baseado no que foi realizado por

Zhang et al. (2010). O tampão ligeiramente ácido foi escolhido para favorecer a reação entre o grupo de aldeído do GA e o grupo de amina secundária da molécula de azul de Coomassie brilhante, conforme descrito anteriormente por Reis (2012). Após esse procedimento, as membranas foram lavadas e imersas em água destilada por 80 minutos, com troca da água a cada 40 minutos. Em seguida, as membranas foram lavadas por meio da permeação de água destilada em sistema com escoamento tangencial até que nenhum vestígio de corante pudesse ser detectado visualmente.

4.7.4.1 Teste para determinar a melhor temperatura de imobilização do azul de Coomassie brilhante

Preliminarmente, um teste para determinar a melhor temperatura de imobilização do azul de Coomassie brilhante foi conduzido. As temperaturas escolhidas para a imersão foram: temperatura ambiente (aproximadamente 26°C), 50°C e 80°C. Zhang et al., (2010) e Akgöl et al., (2003) realizaram a imobilização do corante em 60°C e 80°C, respectivamente.

As membranas foram imersas na solução de corante seguindo o mesmo procedimento descrito no tópico anterior, mas para as temperaturas altas foram usados banhos de água fechados para garantir a manutenção da temperatura durante as 24 horas de imersão.

Para determinar a melhor temperatura, verificou-se àquela em que a água de lavagem da membrana apresentou menor concentração de corante e isso foi feito por comparação da absorção no visível das águas de lavagem no comprimento de onda de absorção máximo do azul de Coomassie brilhante, que é 605 nm.

4.7.5 Caracterização das membranas porosas

A caracterização e avaliação da modificação das membranas porosas foi realizada mediante teste de permeabilidade hidráulica, espectroscopia de FTIR e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

4.7.5.1 Permeabilidade hidráulica

O teste de permeabilidade hidráulica foi conduzido em um sistema com escoamento tangencial à membrana, conforme esquematizado na Figura 13. Para esse teste, água destilada foi bombeada por meio de bomba peristáltica com vazão de $5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ e a pressão foi medida por manômetro com escala de 0 a 2 bar, acoplado ao sistema. O volume de permeado com o tempo foi coletado em proveta. Para manter a pressão do sistema o mais estável possível durante o experimento, o nível do líquido no tanque de alimentação foi mantido constante. Para o teste de permeabilidade hidráulica para a membrana sem modificação, a pressão medida foi de 0,8 bar, para a membrana modificada com PVA e GA, a pressão medida foi de 0,6 bar e para membrana modificada com PVA, GA e azul de Coomassie brilhante a pressão medida foi de 0,8 bar.

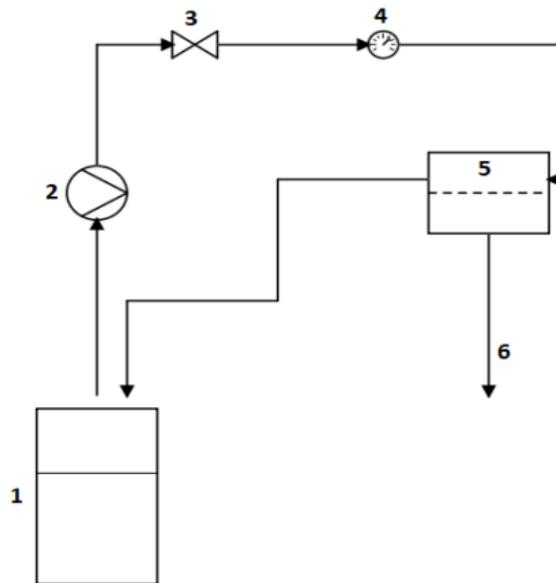


Figura 13- Sistema utilizado para o teste de permeabilidade hidráulica. (1 é o tanque de alimentação, 2 é a bomba peristáltica, 3 é a válvula, 4 é o manômetro, 5 é a célula com a membrana e 6 é o permeado).

4.7.5.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

O FTIR foi realizado para a identificação dos grupos funcionais presentes na superfície das membranas por meio das frequências de vibração desses grupos. Essa análise foi realizada no laboratório pertencente ao Departamento de Engenharia de Minas da UFMG em equipamento de FTIR Bruker modelo Alpha, sendo o modo de aquisição o ATR (Refletância total atenuada) - cristal de diamante, com resolução de 4 cm^{-1} , 24 varreduras e escala de leitura de $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$. As amostras foram secas preliminarmente a temperatura ambiente (26°C).

4.7.5.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A caracterização microestrutural das membranas porosas foi analisada por microscopia eletrônica de varredura no Centro de Microscopia da UFMG. Para tal, a membrana foi seca e cortada em pequenas amostras após imersão em nitrogênio líquido para fratura. Essas amostras foram fixadas no porta-amostras com auxílio de uma fita de carbono e recobertas com uma película de 15 nm de carbono. As imagens da superfície da membrana foram obtidas em microscópio Quanta 200-FEG/FEI com canhão de emissão de campo.

4.7.6 Experimento de adsorção da bromelina em batelada

4.7.6.1 Investigação do melhor pH de adsorção da bromelina

Nesse experimento em batelada, três pHs foram testados: 6,5; 7,0 e 7,5. Esses valores de pH foram escolhidos tendo em vista a faixa ótima de pH da bromelina, que varia de 5,5 a 8,0 (PAVAN et al., 2012). Para tal, a membrana modificada foi submersa em 100 mL de solução de bromelina padrão 1 mg/mL preparada no tampão fosfato $0,2\text{ mol/L}$ adequado e essa solução foi agitada no equipamento *shaker* com as seguintes condições operacionais: 37°C , 200 rpm, por 3 horas. Essas condições foram similares às utilizadas por Zhang et al. (2010).

A quantidade de bromelina adsorvida foi então determinada pela diferença entre a concentração final (C_f) e inicial (C_i) da solução, conforme Equação 6. Essa concentração foi medida pelo método de quantificação de proteína total.

$$\frac{Massa_{bromelina\ adsorvida}(mg)}{Massa_{membrana}(g)} = \frac{(C_f - C_i)100}{Massa_{membrana}} \quad (6)$$

4.7.7 Teste de adsorção de BSA em sistema contínuo

Para esse teste, o sistema com escoamento tangencial apresentado na Figura 13 foi utilizado. 1 L de solução de BSA em tampão fosfato pH 7,0, 0,2 mol/L, com concentração próxima a 0,06 mg/mL foi colocada no tanque de alimentação sendo bombeada até a célula contendo a membrana porosa modificada. A amostra de permeado final foi coletada após 30 minutos de funcionamento do sistema e a massa de BSA adsorvida foi calculada pelo balanço de massa da Equação 7. As concentrações foram medidas pelo método de Bradford.

$$(mg)BSA_{adsorvida} = (mg)BSA_{alimentação} - (mg)BSA_{permeados} - (mg)BSA_{concentrado} \quad (7)$$

4.8 SÍNTESE E MODIFICAÇÃO DAS MEMBRANAS DENSAS

4.8.1 Síntese das membranas densas de PVA

Para o preparo das membranas densas, 200 mL de soluções de PVA 2% m/m foram preparadas em balão de fundo redondo em sistema de agitação e condensação durante 1 hora com temperatura média de 95°C. Após o resfriamento dessa solução, foi adicionado a ela 0,8 g de solução de GA 5% m/m, de forma que a proporção entre o PVA e o GA fosse de 0,0044

mol GA/ mol de PVA. Essas soluções foram então misturadas em agitador magnético por 10 minutos para a completa dispersão do GA no PVA. Posteriormente, essa mistura foi espalhada em placas de petri com 9 cm de diâmetro e foram secas a 40°C em estufa durante 48 h. A escolha da temperatura foi realizada com base na literatura (FIGUEIREDO; ALVES; BORGES, 2008). Ao final desse procedimento e após o resfriamento das placas, os filmes densos formados foram removidos e armazenados em recipientes hermeticamente fechados.

4.8.2 Modificação das membranas densas

As membranas densas produzidas foram submetidas aos mesmos processos de modificação superficial utilizados para a membrana porosa, que envolve uma etapa de modificação com GA e outra com o azul de Coomassie brilhante. Três condições de preparo de membrana densa foram testadas. A primeira foi uma membrana produzida apenas pelo procedimento descrito no tópico anterior, sem modificação adicional, a segunda foi uma membrana produzida como anteriormente, mas acrescida de uma etapa de modificação com azul de Coomassie brilhante e a terceira foi uma membrana densa modificada pelo GA seguida pela modificação com o azul de Coomassie brilhante.

As modificações pelo GA e pelo azul de Coomassie brilhante foram feitas por meio da imersão das membranas nas soluções desses compostos. Foi utilizada a mesma concentração do corante (10 g/L em pH 5,0) e a melhor concentração de GA obtida no desenvolvimento da membrana porosa. As membranas foram imersas nas soluções de GA e de azul de Coomassie brilhante por 24 h, sendo secas naturalmente a temperatura ambiente (26°C).

4.8.3 Teste de adsorção do BSA na membrana densa

Para verificar o melhor procedimento de produção das membranas densas, foi realizado um teste de adsorção da proteína BSA na membrana. Esse teste foi conduzido em banho de aquecimento com agitação na temperatura de 37°C durante 3 h em tampão 7,0 de

fosfato, 0,2 mol/L. O primeiro teste foi feito em 4 h, mas verificou-se que a após 3 h, a concentração permanecia constante.

Para o teste, 200 mL de soluções de BSA com concentrações próximas a 0,06 mg/mL preparadas em tampão 7,0 de fosfato 0,2 mol/L foram colocadas em contato com as membranas em banho de aquecimento. A concentração de BSA na solução foi medida pelo método de Bradford no início e no fim do tempo do experimento. A diferença entre a concentração inicial (C_i) e a final (C_f) foi atribuída à adsorção do BSA na membrana. As massas das membranas secas foram registradas antes do teste e a quantidade de massa de BSA adsorvida por massa de membrana foi calculada para cada tipo de membrana, conforme Equação 8.

$$\frac{Massa_{BSA\ adsorvida}(mg)}{Massa_{membrana}(g)} = \frac{(C_f - C_i)200}{Massa_{membrana}} \quad (8)$$

4.8.4 Caracterização das membranas densas

A caracterização e avaliação da modificação das membranas densas foi realizada através do teste de ponto de carga zero, espectroscopia de FTIR e MEV.

4.8.4.1 Ponto de carga zero

A determinação do ponto de carga zero foi empregada para determinar o valor de pH em que a superfície da membrana apresenta carga neutra. A metodologia para essa determinação consistiu em se preparar várias misturas de 50 mg de membrana densa em 50 mL de soluções aquosas sob diferentes condições de pH inicial. O pH inicial foi medido assim como o pH final após 24h de agitação a 25°C. Para garantir a manutenção da temperatura, foi utilizado banho termostaticado. O ponto de carga zero da membrana foi obtido na faixa de pH onde se observa um efeito tampão, ou seja, onde o pH não sofre variação. Essa propriedade é importante pois permite prever a ionização de grupos funcionais da superfície e sua interação com espécies em solução. Essa metodologia foi baseada no procedimento proposto por Schimmel (2008). A

faixa de pH investigada variou de 4,0 a 9,0. Essa escolha foi feita levando-se em consideração o pH ótimo de atividade da bromelina.

4.8.4.2 FTIR

Foi utilizada metodologia semelhante à que foi empregada para as membranas porosas.

4.8.4.3 MEV

Foi utilizada metodologia semelhante à que foi empregada para as membranas porosas.

4.8.5 Teste de dessorção da proteína BSA

Com base no resultado obtido no teste de ponto de carga zero da membrana, foi possível propor uma metodologia para a dessorção da BSA. Foram utilizadas condições brandas, dentro da faixa ótima de pH das proteínas. A mesma membrana submetida ao processo de adsorção foi utilizada para o teste de dessorção. O teste de adsorção feito preliminarmente ao teste de dessorção foi realizado sob as mesmas condições operacionais adotadas anteriormente: 37°C por 3 h. No entanto, a concentração de BSA adotada para a adsorção foi de aproximadamente 0,13 mg/mL. O teste de dessorção foi conduzido em banho com temperatura controlada a 45°C, em solução de NaOH, pH 8,0, durante 24 h. Em testes preliminares feitos em temperaturas mais baixas, a concentração de BSA dessorvida não pôde ser detectada.

4.8.6 Teste de adsorção e dessorção da bromelina

O teste de adsorção da bromelina à membrana densa foi realizado sob as condições operacionais adotadas nos ensaios anteriores: 100 mL de solução de bromelina foi colocada em contato com a membrana a 37°C por 3 h em tampão de fosfato 0,2 mol/L pH 6,5; que se mostrou o melhor pH de adsorção da bromelina. No entanto, a concentração de bromelina empregada foi de 2 mg/mL, essa concentração mais elevada foi utilizada tendo em vista que a bromelina comercial, mesmo sendo considerada padrão, apresenta baixo teor de proteínas. As concentrações proteicas iniciais e finais após adsorção e dessorção foram medidas pelo método de Bradford, assim como a atividade enzimática inicial, após adsorção e final após o processo de dessorção. Para a dessorção da bromelina, utilizou-se a condição na qual foi possível dessorver a BSA, ou seja, 45°C por 24 h em pH 8,0 (NaOH).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os principais resultados a serem apresentados nessa seção são resumidos na Tabela 1.

Tabela 1- Principais resultados obtidos para as membranas porosas e densas.

	Membrana porosa	Membrana densa
Condições de síntese	<ul style="list-style-type: none"> • Avaliação da condição de secagem de PVA; • Variação da concentração de GA; • Variação da temperatura de imobilização do azul de Coomassie brilhante. 	<ul style="list-style-type: none"> • As melhores condições de preparo obtidas para a membrana porosa foram utilizadas para o desenvolvimento das membranas densas.
Caracterização	<ul style="list-style-type: none"> • MEV; • Permeabilidade hidráulica; • FTIR. 	<ul style="list-style-type: none"> • MEV; • Ponto de carga zero (PZC); • FTIR.
Testes realizados	<ul style="list-style-type: none"> • Investigação do melhor pH de adsorção de bromelina; • Adsorção de BSA em sistema contínuo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Teste de adsorção de BSA para definir o melhor preparo de membrana densa; • Dessorção da BSA na membrana; • Adsorção e dessorção de bromelina.

5.1 MEMBRANAS POROSAS

5.1.1 Secagem da membrana

Duas condições de secagem do PVA na membrana porosa foram testadas: 30°C por 1 h em estufa e temperatura de aproximadamente 26°C por 48 h. A escolha da melhor condição foi baseada na avaliação dos espectros por infravermelho, que são apresentados na Figura 14.

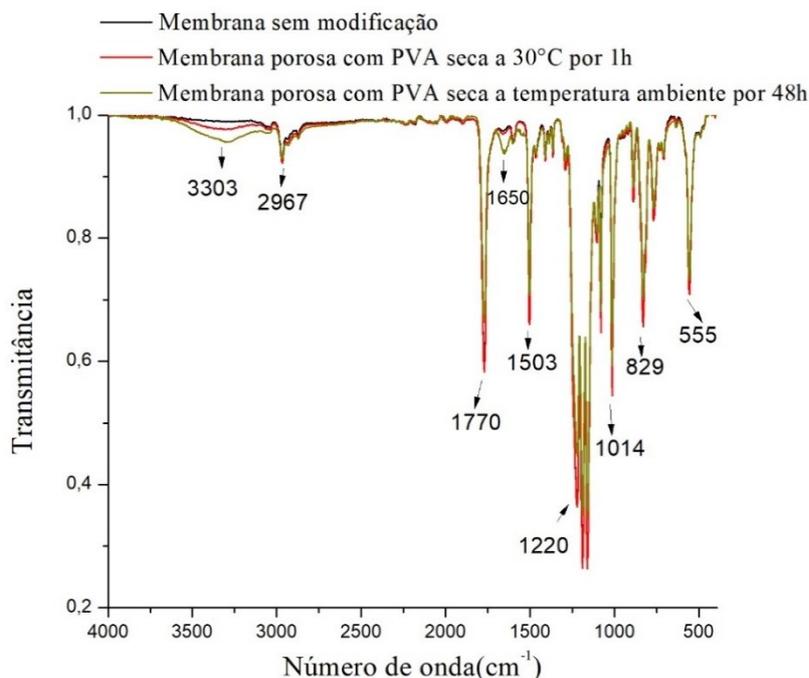


Figura 14- Espectro de infravermelho das membranas porosas sem modificação e modificadas com PVA em 26°C e a 30°C.

A banda de absorção próxima a 2967 cm^{-1} é típica dos grupos $-\text{CH}_3-$ do policarbonato, PC, (ORÉFICE; VASCONCELOS; MORAES, 2004) e o pico pronunciado em 1770 cm^{-1} é devido à vibração dos grupos carbonila $\text{C}=\text{O}$ (KAMPS et al., 2018). A região aromática do PC é identificada pelos picos em 1220 cm^{-1} (KIM et al., 1997) e pelo pico no intervalo de $800\text{--}900\text{ cm}^{-1}$, típico das vibrações C-H de anéis aromáticos (SHEKHAWAT; SHARMA; AGGARWAL, 2011), o pico próximo a 1015 cm^{-1} é devido ao grupo carbonato O-C-O simétrico (PARSHIN et al., 2013).

A presença do pico em 3303 cm^{-1} nas membranas que passaram pelo processo de modificação por PVA, sugere a presença de grupos hidroxila nestas amostras. A faixa típica para ligações O-H ocorre entre $3200\text{--}3550\text{ cm}^{-1}$ (REIS et al., 2006). O pico mais pronunciado para a membrana que foi seca em temperatura ambiente (26°C) indicou que esse procedimento foi o mais eficiente. No entanto, vale ressaltar que a água retida na estrutura, no processo mais brando de secagem, pode também ter contribuído com o pico.

5.1.2 Concentração de GA

Os resultados de adsorção de BSA nas três membranas de afinidade porosas produzidas com três concentrações de GA diferentes são exibidos na Tabela 2. A Tabela mostra as quantidades de BSA adsorvidas por grama de membrana. A concentração da solução inicial de BSA utilizada foi de 1,01 mg/mL. As concentrações deste teste e dos demais foram avaliadas pela determinação da quantidade de proteína total, cuja curva de calibração é mostrada no Apêndice A.

Tabela 2- Resultados para a quantificação da adsorção para a avaliação das concentrações de GA empregadas.

Massa da membrana (g)	Concentração de GA (mol/mL)	Massa de BSA (mg) adsorvida por grama de membrana (g)
0,0299	$1,96 \times 10^{-5}$	297,28
0,0305	$1,96 \times 10^{-4}$	0,00
0,0311	$1,96 \times 10^{-3}$	0,00

É possível observar dos resultados da Tabela 2, que houve impacto significativo na adsorção em função das concentrações testadas, e como nas concentrações mais altas não foi possível quantificar a adsorção, optou-se por utilizar a concentração mais baixa de GA, $1,96 \times 10^{-5}$ mol/mL, para o desenvolvimento das membranas porosas e densas.

O efeito da variação da concentração de glutaraldeído na adsorção de BSA pode não ter sido percebido nas concentrações mais altas, pelo fato do GA ter a tendência de formar oligômeros nessas concentrações (FIGUEIREDO, 2008). Os oligômeros possuem uma estrutura mais fechada e, portanto, menos sítios para a ligação.

5.1.3 Temperatura de imobilização do azul de Coomassie brilhante

Três temperaturas para a imobilização do azul de Coomassie brilhante foram testadas: temperatura ambiente (aproximadamente 26°C), 50°C e 80°C. Nesse trabalho, optou-se por testar condições mais brandas do que foram adotadas por outros autores, por isso utilizou-se 50°C, como temperatura intermediária e a temperatura ambiente. Zhang et al. (2010) e Akgöl et al. (2003), por exemplo, fizeram a imobilização do corante azul de Cibacron em membranas

de poliacrilonitrila e poliamida, respectivamente, a 80°C e He, Gan e Sun (1997) fizeram a imobilização do mesmo corante em *Sepharose* a 45°C.

A identificação e a avaliação da concentração do corante na água de lavagem se deu pela leitura da absorbância do azul de Coomassie brilhante, cujo comprimento de onda máximo é de 605nm, conforme Figura 15.

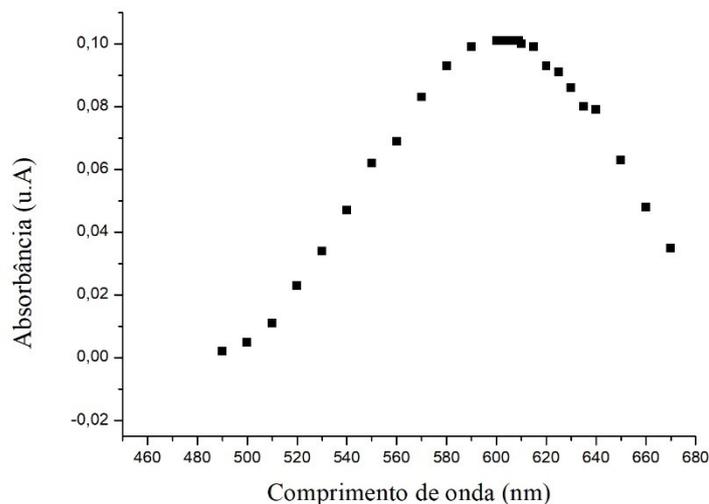


Figura 15- Comprimento de onda máximo do corante Azul de brilhante.

Por meio do coeficiente de extinção molar do azul de Coomassie brilhante que é 33,800 L. mol⁻¹.cm⁻¹ (QUEIROZ, 2007), foi possível fazer uma estimativa da concentração de corante presente na água de lavagem. Sendo o caminho óptico igual a 1 cm e aplicando-se a Lei de Beer, calculou-se a concentração residual do corante nas três condições de temperaturas de imobilização testadas. Os resultados obtidos são exibidos na Tabela 3.

Tabela 3- Concentrações residuais do corante azul de Coomassie brilhante na água de lavagem das membranas.

Temperatura	Absorbância média	Concentração residual (mol/L)
Ambiente (26°C)	0,001	2,96 x 10 ⁻⁵
50°C	0,001	2,96 x 10 ⁻⁵
80°C	0,004	1,18 x 10 ⁻⁴

Observou-se que a concentração do corante na água de lavagem nos três testes foi muito baixa, indicando que após aderido à superfície da membrana, física ou quimicamente, este não é removido facilmente. Vale ressaltar que logo após a impregnação do corante, as membranas apresentavam-se com a mesma coloração.

Considerando-se os custos envolvidos no processo, optou-se, então, por utilizar temperatura ambiente no preparo das membranas. No entanto, meses após essa conclusão,

observou-se que as membranas adquiriram colorações diferentes, Figura 16, sugerindo que a variação dessa condição poderia ter influenciado a fixação do corante à membrana.

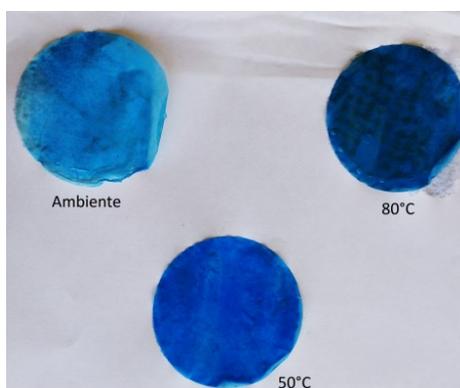


Figura 16- Membranas produzidas por três temperaturas de imobilização do corante: ambiente, 50°C e 80°C.

A adsorção é um processo tipicamente exotérmico (ZHANG et al., 2016), então o fato da membrana que sofreu imobilização de corante a 80°C ter ficado com a coloração mais forte, pode sugerir que não a adsorção, mas sim a reação química entre o corante e a membrana modificada com GA foi a responsável pela fixação do adsorvente, e essa foi favorecida com o aumento da temperatura. Outra hipótese seria que membrana produzida a 80°C ficou mais suscetível a uma degradação do corante pela luz, o que fez com que essa escurecesse mais.

5.1.4 MEV

A imagem da superfície da membrana porosa exibida na Figura 17 mostra poros retos e cilíndricos, típicos de uma membrana produzida pelo método de gravação, que é o caso da membrana de policarbonato.

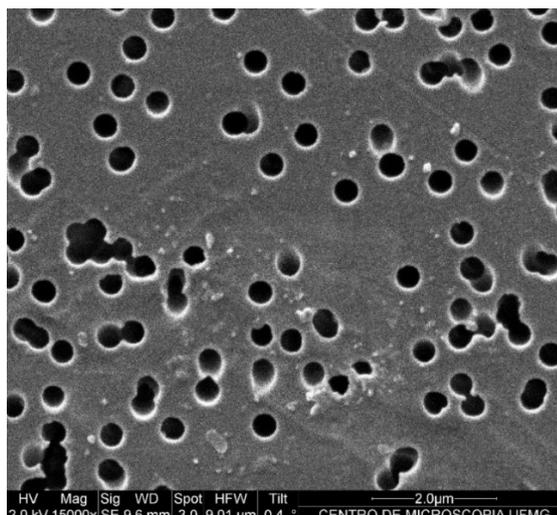


Figura 17- Imagem da superfície da membrana porosa modificada por microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 15000 vezes.

Não é possível afirmar que os pontos brancos que aparecem na superfície da membrana são devido à modificação superficial ou se são particulados presentes na atmosfera. Além disso, não é possível afirmar que a modificação causou alteração no tamanho dos poros tendo em vista que os poros se mantiveram bem distribuídos e com faixa de tamanho de 0,4 μm , valor especificado pelo fabricante. Não se previa que a modificação na superfície fosse capaz de alterar de forma tão visível os poros, mas o fato de o fluxo de permeado ter reduzido, conforme será mostrado a seguir, pode ser uma indicação da presença de macromoléculas, como PVA, nos poros da membrana de PC.

5.1.5 Permeabilidade hidráulica

Os fluxos de água foram calculados por meio da Equação 1 e plotados em função do tempo de permeação para as três membranas testadas: membrana sem modificação, membrana modificada com PVA e GA e membrana modificada com PVA, GA e azul de Coomassie brilhante, conforme mostrado na Figura 18. Para o cálculo, utilizou-se a área da membrana que foi igual a 11cm².

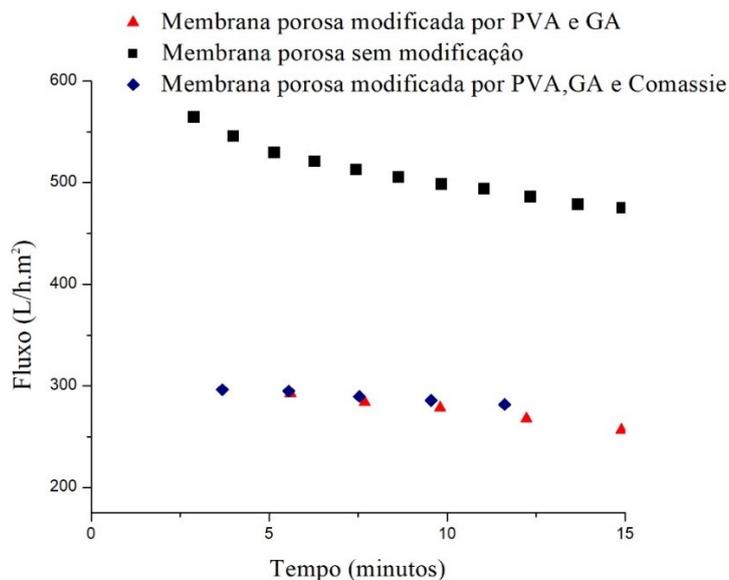


Figura 18- Variação do fluxo com o tempo de operação para a membrana sem modificação, modificada com PVA e GA e modificada com PVA, GA e azul de Coomassie brilhante.

O ligeiro decréscimo observado nas curvas no início do experimento é devido à estabilização do sistema e compactação da membrana. A permeabilidade hidráulica média obtida para a membrana sem modificação foi igual a $609,7 \text{ L/h.m}^2\text{.bar}$, de acordo com a faixa esperada para membranas de microfiltração.

Em comparação com a membrana sem modificação, a membrana que passou pelo processo de modificação com PVA e GA teve sua permeabilidade média reduzida em 22,0%. Já a membrana que passou por todos os processos de modificação teve a permeabilidade média reduzida em 26,0% em relação à membrana original. Essas reduções na permeabilidade sugerem que, de alguma forma, a superfície das membranas foi modificada pela deposição e ligação de grupos fazendo com que os poros se tornassem mais estreitos, dificultando o fluxo. A presença de PVA gelificado nos poros da membrana pode justificar esse declínio. Além disso, observa-se que a etapa de modificação adicional com o corante azul de Coomassie brilhante não reduz de forma significativa a permeabilidade hidráulica da membrana.

O esquema apresentado na Figura 19 exhibe o possível processo de deposição e formação de grupos na superfície da membrana que justificariam a redução do fluxo. CB representa o azul de Coomassie brilhante.

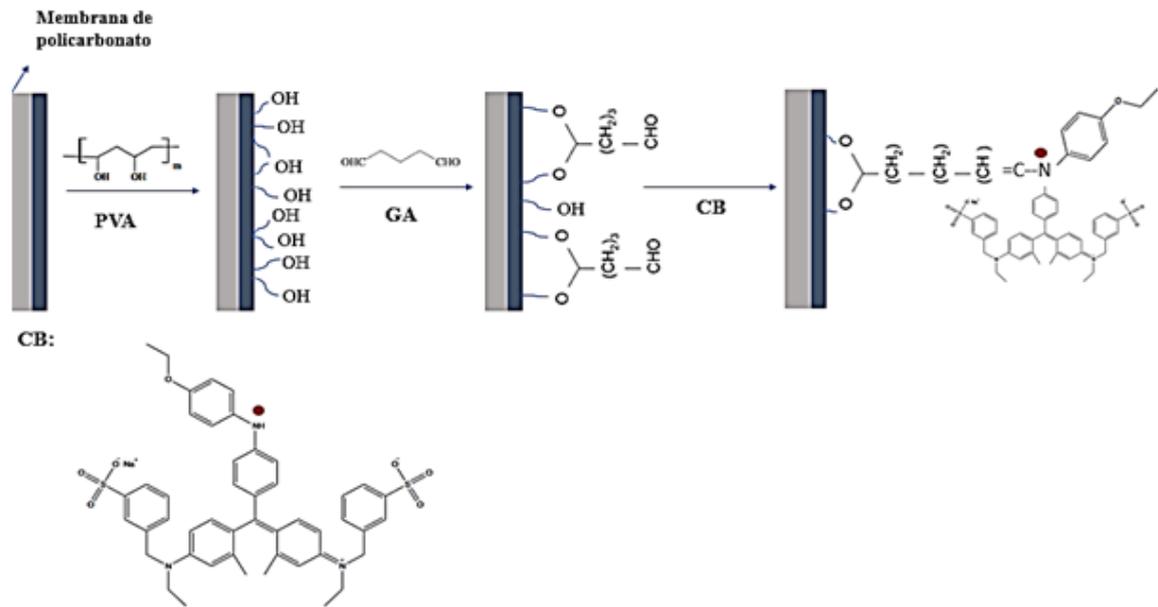


Figura 19- Deposição e formação de grupos formados na superfície da membrana porosa de policarbonato.

Da etapa inicial até a modificação com GA, ocorre o decréscimo mais significativo no fluxo permeado. Apesar da molécula do corante ser volumosa, como a redução do fluxo é pequena, após essa modificação, espera-se que a quantidade de corante impregnada seja pequena.

A primeira etapa, conforme mostrado na Figura 19, diz respeito à deposição de grupos hidroxilas provenientes do PVA, a segunda é a etapa de reticulação do PVA com o GA e a terceira etapa está representando a reação que ocorre entre o grupo CHO do GA com a amina secundária do corante.

5.1.6 FTIR

A análise de espectroscopia por infravermelho foi realizada para a membrana porosa comercial sem modificação e para a membrana com modificação pelo GA e pelo corante azul de Coomassie brilhante.

Os espectros das membranas são exibidos na Figura 20. A linha preta representa o espectro da membrana sem modificação e a linha vermelha representa o espectro da membrana modificada.

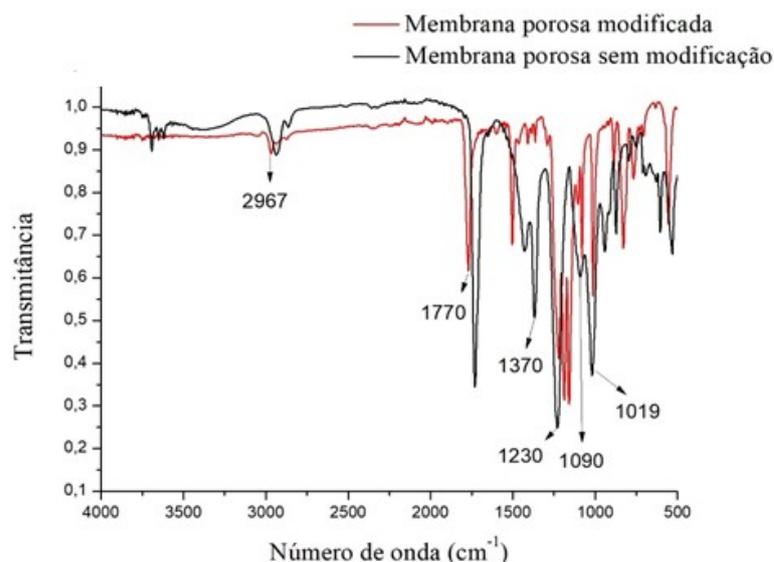


Figura 20- Espectro no infravermelho para as membranas porosas sem modificação e modificada.

Os dois picos das membranas próximos a 2967 cm^{-1} indicam a presença dos grupos $\text{-CH}_3\text{-}$ do policarbonato nas duas membranas. De acordo com Oréfica, Vasconcelos e Moraes (2004), a banda de absorção próximo a 2969 cm^{-1} é típica desse grupo. O pico para a membrana porosa sem modificação é mais pronunciado do que para a membrana modificada, sugerindo que as camadas depositadas cobriram, de alguma forma, os grupos metil da superfície da membrana comercial original.

Os picos próximos a 1770 cm^{-1} são advindos da vibração dos grupos carbonila C=O (KAMPS et al., 2018). O menor pico observado para a membrana modificada indica que parte dos grupos carbonila pode ter reagido com os grupos hidroxila do PVA. Os picos próximos a 1220 cm^{-1} em ambas as membranas, são devido aos grupos aromáticos presentes na molécula de policarbonato (KIM et al., 1997). Não foi possível identificar picos específicos para o azul de Coomassie brilhante, indicando que a quantidade impregnada foi baixa.

5.1.7 pH de adsorção de bromelina

Três pHs: 6,5, 7,0 e 7,5 foram testados para verificar em qual ocorria a adsorção máxima de bromelina. Os valores de pH escolhidos foram baseados na faixa de atividade ótima

da enzima. Os resultados são resumidos na Tabela 4. A concentração inicial de bromelina lida foi de 0,087 mg/mL. Apesar da solução ter sido preparada para 1 mg/mL, verificou-se que a bromelina padrão apresentava baixa pureza, que é inerente à dificuldade que existe durante a sua purificação.

Tabela 4- Variação da adsorção de bromelina em função do pH empregado.

Tampão	Concentração final de bromelina (mg/mL)	Massa de bromelina adsorvida (mg)	Massa de bromelina adsorvida por massa de membrana (mg/g)
6,5	0,0686	1,8259	61,07
7,0	0,0732	1,3667	45,71
7,5	0,0754	1,1444	38,28

De acordo com a Tabela 4, observa-se que existe diferença na adsorção nos três pHs empregados e que no pH 6,5 ocorre a maior adsorção. Esse então, foi o pH escolhido para os testes de adsorção de bromelina.

Zhang et al. (2010) estudaram a adsorção de bromelina em membrana de afinidade de nanofibra de poliácridonitrila e verificaram que a membrana produzida poderia adsorver 161,6 mg de bromelina por grama de membrana. O resultado do presente trabalho é inferior ao encontrado por esses autores, mas se torna significativo uma vez que foi obtido usando-se materiais, reagentes e métodos mais acessíveis e de baixo custo. Todas as modificações propostas aqui foram feitas também em temperatura ambiente (aproximadamente 26°C) o que significa menor custo operacional. Outro ponto a se destacar é que a área superficial da membrana de Zhang et al. (2010) de 1080 m²/grama de membrana é muito superior à empregada neste trabalho, que é aproximadamente 3,6 x 10⁻² m²/grama de membrana, desconsiderando-se os poros.

Chen e Huang (2004) estudaram o efeito do pH na adsorção de bromelina do caule em nanopartículas magnéticas de óxido de ferro e verificaram que em soluções com pH entre 3 e 5, a quantidade de bromelina adsorvida não é significativamente afetada pelo pH, mas que em pH maiores que 5 a quantidade adsorvida diminui acentuadamente com o aumento do pH, o que foi observado no presente trabalho. Han et al. (2019) também estudaram o efeito do pH na adsorção de bromelina do caule em microesferas magnéticas e verificaram que a adsorção atingiu um valor máximo de 117 mg de bromelina por grama de microesfera em pH 6,0.

A bromelina do caule apresenta ponto isoelétrico de 9,55, o que significa que ela apresenta carga positiva nos pHs que foram testados. A carga superficial da membrana de policarbonato é negativa nesses pHs, de acordo com Nakamura, Orime e Matsumoto (2012), logo poderia-se propor que a interação entre o corante e a bromelina do caule seria eletrostática.

Sendo assim, a maior adsorção da bromelina em pH mais baixo seria justificada pelo fato da bromelina nesse pH estar mais afastada do seu ponto isoelétrico e portanto, mais positiva, se comparada aos outros pontos, resultando em força eletrostática mais forte. Arumugam e Ponnusami (2013) encontraram resultado semelhante estudando a adsorção da bromelina em material funcionalizado de sílica sintética. Esses autores observaram a redução da adsorção da bromelina com o aumento do pH e também verificaram que a interação eletrostática era a responsável pela adsorção.

5.1.8 Adsorção de BSA em sistema contínuo

A bromelina foi substituída em muitos testes pela BSA, pois essa última é uma proteína modelo e é encontrada com pureza elevada no mercado, enquanto a bromelina comercial apresenta baixo grau de pureza e em solução apresenta-se como uma solução muito turva, que poderia dificultar o processo de adsorção. Por isso, optou-se pela substituição, para que fosse possível provar o conceito da adsorção na membrana de afinidade e para não adicionar mais variáveis ao processo.

No teste de adsorção de BSA em sistema contínuo, as massas de BSA contidas na alimentação, nos permeados e no concentrado final retido no tanque foram calculadas e são exibidas da Tabela 5. A massa de BSA adsorvida por massa de membrana foi calculada pelo balanço da Equação 6 e pelos dados da Tabela 5.

Tabela 5- Resultados para o teste de adsorção da BSA em sistema contínuo.

Massa da membrana (g)	Amostra	Concentração (mg/mL)	Massa de BSA (mg)	Massa de BSA adsorvida por massa de membrana (mg/g)
0,03072	Alimentação	0,0591	57,93	67,71
	1º permeado	0,0363	1,64	
	Permeado final	0,0536	0,32	
	Concentrado	0,0627	53,89	

Conforme pode ser observado na Tabela 5, foi possível adsorver 67,71 mg de BSA por grama de membrana em sistema contínuo. Zhang et al. (2016) produziram microesferas magnéticas de afinidade por meio da reação do corante azul de Cibacron na superfície dessas

partículas e avaliaram o processo de adsorção de BSA. A capacidade máxima obtida foi de 114,0 mg por grama de microesfera.

Novamente, apesar do valor encontrado ser inferior ao apresentado pela literatura, o ganho do presente trabalho está principalmente no fato de se conseguir valores com a mesma ordem de grandeza do que é relatado por outros autores, utilizando-se materiais e metodologias mais acessíveis e menos onerosas.

Neste trabalho não foi testada a influência do pH na adsorção da BSA, mas em meios mais ácidos, por exemplo, próximo ao ponto isoelétrico da BSA (4,9), a carga negativa do corante poderia ser reduzida pela protonação dos grupos sulfonados presentes nele e o efeito da repulsão BSA/corante poderia ser minimizado, fazendo com que a adsorção aumentasse. Assim, maiores valores para a adsorção poderiam ser encontrados. Zhang et al. (2016) constatou esse resultado ao determinar a capacidade máxima de adsorção em pH 5,0. No entanto, o ideal é se manter em uma faixa de pH próxima ao neutro para se evitar a desnaturação da proteína.

5.2 DAS MEMBRANAS POROSAS ÀS MEMBRANAS DENSAS

A ideia inicial era a de realizar a modificação superficial de uma membrana porosa de microfiltração comercial e avaliar se essa membrana após a modificação, poderia funcionar como uma membrana de afinidade para a separação e concentração da bromelina. No entanto, pelo fato da área projetada dessa membrana ser pequena, tornou-se inviável avaliar esse processo, pois ficou difícil perceber quantitativamente, de forma razoável, a adsorção. Aliado a isso, o fato da bromelina comercial apresentar alto grau de impurezas, agravou a situação, pois, ou se trabalhava com um sistema muito concentrado, para garantir a concentração necessária, mas nesse caso, o sistema ficava muito turvo, aumentando a resistência do transporte da proteína à superfície da membrana; ou se trabalhava com sistemas muito diluídos e a quantidade de bromelina adsorvida era muito pequena para ser detectada. Esse foi um dos motivos pelos quais a bromelina foi substituída pela BSA em muitos testes. Tendo em vista essas questões então, a partir desse ponto, optou-se por trabalhar também com membranas densas produzidas no laboratório, com área superficial projetada relativamente maior, de forma que fosse possível avaliar melhor o processo de adsorção. Nesse caso, por ser densa, a membrana produzida seria empregada de forma diferente, poderia ser usada, por exemplo, para

a separação dos constituintes voláteis, como essências, do extrato do abacaxi ou como membrana de afinidade no processo de diálise.

5.3 MEMBRANAS DENSAS

5.3.1 Teste de adsorção de BSA em membrana densa

Conforme descrito na metodologia, três condições de preparo de membrana densa foram investigadas e a avaliação do melhor preparo foi realizada por meio do teste de adsorção da proteína BSA em pH 7,0 na membrana produzida. A foto da Figura 21 representa a membrana densa produzida por meio da modificação com o GA e com o corante azul de Coomassie brilhante e a Tabela 6 exibe os resultados obtidos para o teste de adsorção em cada tipo de membrana.

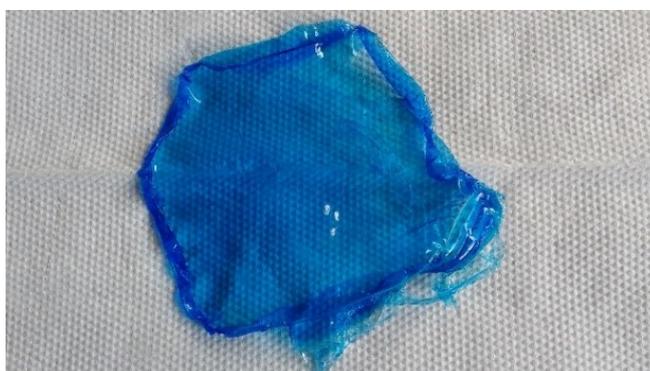


Figura 21- Membrana densa produzida submetida à modificação pelo GA e pelo azul de Coomassie brilhante.

Tabela 6- Teste de adsorção de BSA obtidos para os três tipos de membranas densas testadas.

Tipo de membrana densa	Massa da membrana (g)	Concentração inicial de BSA (mg/mL)	Concentração final de BSA (mg/mL)	Massa BSA adsorvida por massa de membrana (mg/g)
Sem modificação adicional	1,0834	0,056	0,052	0,7
Modificada com azul de Coomassie brilhante	0,9329	0,065	0,057	1,7
Modificada com GA e azul de Coomassie brilhante	0,6693	0,048	0,038	2,9

De acordo com a Tabela 6, verifica-se que a membrana que foi submetida sequencialmente ao processo de modificação com GA e azul de Coomassie brilhante foi a que apresentou melhor adsorção, ou seja, maior quantidade de BSA adsorvida por massa de membrana. Esse resultado é 76% melhor que o apresentado pela membrana sem modificação superficial adicional.

Em comparação com a membrana sem modificação, a membrana que foi submetida diretamente ao processo de modificação com o azul de Coomassie brilhante apresentou uma melhora de 59%.

Esses resultados demonstram que a modificação foi crucial para o aumento da funcionalidade da membrana e é justificado pelo fato da membrana modificada possuir grupos em sua superfície capazes de interagir com a proteína. Um esquema parecido ao que foi proposto para a membrana porosa é sugerido para a membrana densa na Figura 22, sendo que a diferença agora é que a base é uma membrana de PVA reticulada com GA. CB representa o azul de Coomassie brilhante.

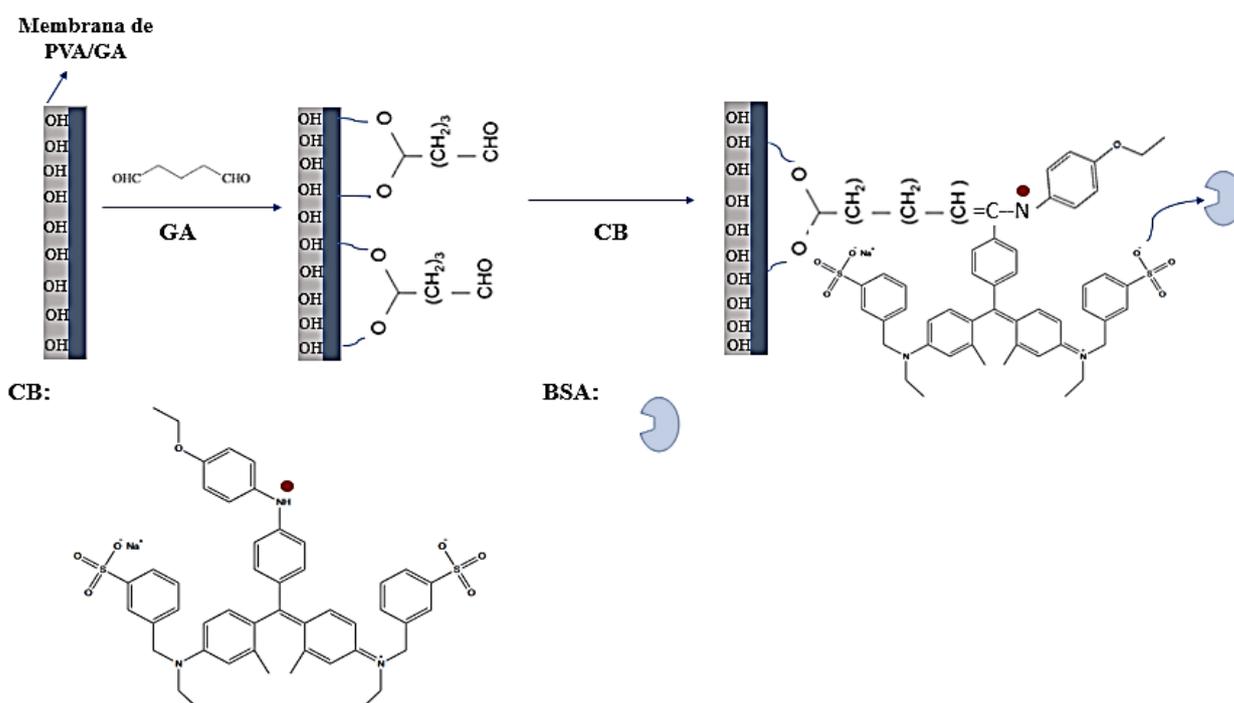


Figura 22- Deposição e formação de grupos formados na superfície da membrana densa de PVA/GA.

Uma interação possível que justifica a interação da BSA como o corante é aquela que ocorre entre os grupos nitrogenados residuais de arginina e lisina presentes na molécula da BSA e os grupos sulfonados do corante (HE; GAN; SUN, 1997), possivelmente numa interação do tipo ácido/base.

Pelo fato das membranas densas serem sintetizadas em laboratório, foi possível trabalhar com áreas projetadas maiores, mas os poros da membrana comercial contribuíram muito para a área superficial total dessas membranas, razão pelo qual os maiores resultados de adsorção foram alcançados com a membrana porosa.

5.3.2 MEV

A imagem da superfície da membrana densa é exibida na Figura 23.

Não foi possível observar a presença de poros e não é possível afirmar que as estruturas que aparecem na superfície da membrana são devido à modificação superficial.

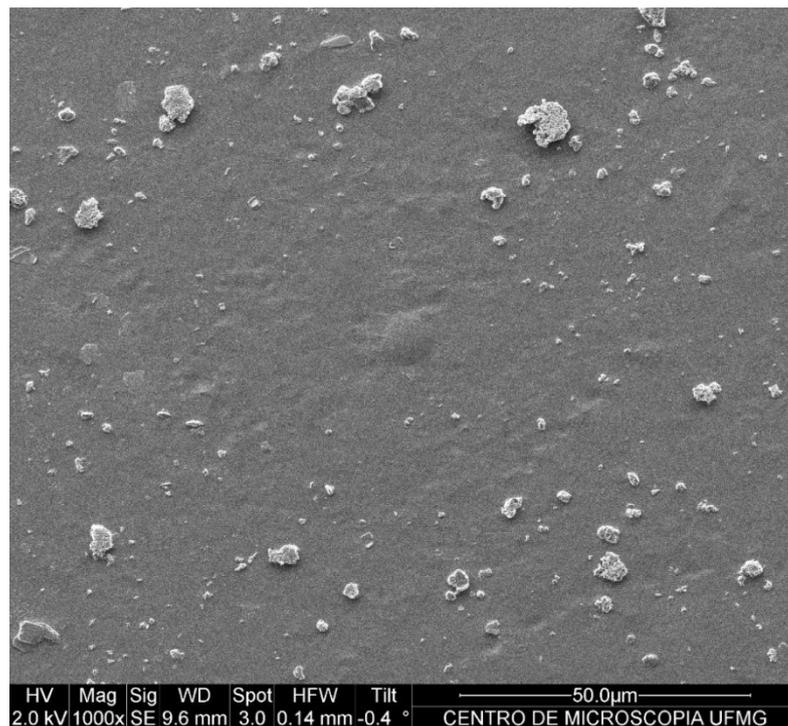


Figura 23- Imagem da superfície densa modificada por microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 1000 vezes.

5.3.3 Ponto de carga zero (PCZ)

O resultado obtido para o ponto de carga zero da membrana está descrito na Figura 24. O gráfico mostra a variação do pH ($\text{pH final} - \text{pH inicial}$) em função do pH inicial.

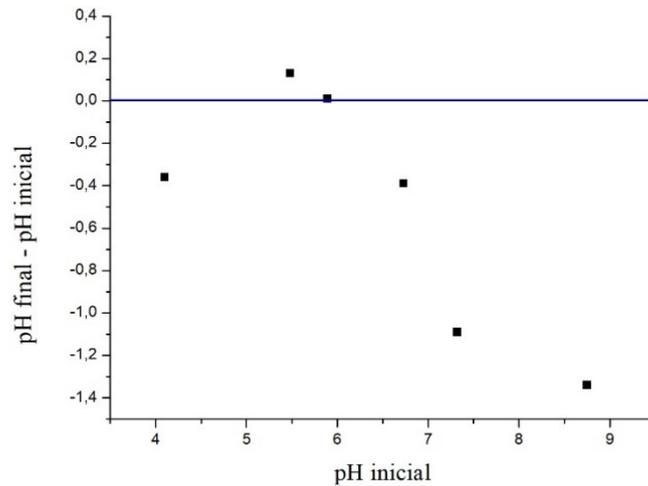


Figura 24- Ponto de carga zero da membrana densa produzida.

O ponto de carga zero é observado na região em que o pH permanece constante ou onde a diferença entre o pH final e inicial é zero. Isso ocorre em pH aproximadamente 6,0, tendo em vista que o ponto da curva em pH inicial 4,0 parece ter um erro experimental.

Assim, valores de pH menores que 6,0 indicam que a carga superficial da membrana será positiva e valores de pH maiores do que 6,0 indicam que a carga superficial da membrana será negativa (ORSOLETTA, 2017). Tendo em vista que os testes de adsorção de BSA na membrana foram feitos em pH 7,0 e sabendo-se que o ponto isoelétrico da BSA é igual a 4,9, observa-se que ambos, durante o processo de adsorção, apresentam carga superficial negativa.

Apesar de ser sugerido que os resíduos de histina, presentes em grande quantidade na BSA, desempenham um importante papel na interação eletrostática entre proteína e corante (HE; GAN; SUN, 1997), esse resultado mostra que o tipo de interação entre a proteína e a membrana não deve ser eletrostática, uma vez que as cargas do adsorvente e do adsorvato são iguais. Do ponto de vista da dessorção, pode ser interessante ter uma interação como essa, uma vez que o objetivo final é recuperar a proteína aderida na membrana. Se a interação for muito forte, pode ser que a dessorção não seja alcançada.

Em relação à bromelina, observa-se que a originada da fruta apresenta ponto isoelétrico igual 4,6, próximo ao ponto de carga zero da BSA, o que sugere que o mecanismo de interação deve ser parecido. A bromelina do caule apresenta ponto isoelétrico igual a 9,55, sugerindo a possibilidade de uma interação eletrostática, uma vez que no pH do teste de adsorção, a bromelina estaria carregada positivamente.

5.3.4 FTIR

A análise de espectroscopia por infravermelho foi feita para a membrana densa sem modificação e para a membrana que sofreu modificação com o GA e com o azul de Coomassie brilhante, sendo essa a que mostrou melhor resultado em termos de adsorção de BSA.

Os espectros das membranas são exibidos na Figura 25. A linha preta representa o espectro da membrana sem modificação e a linha vermelha representa o espectro da membrana modificada.

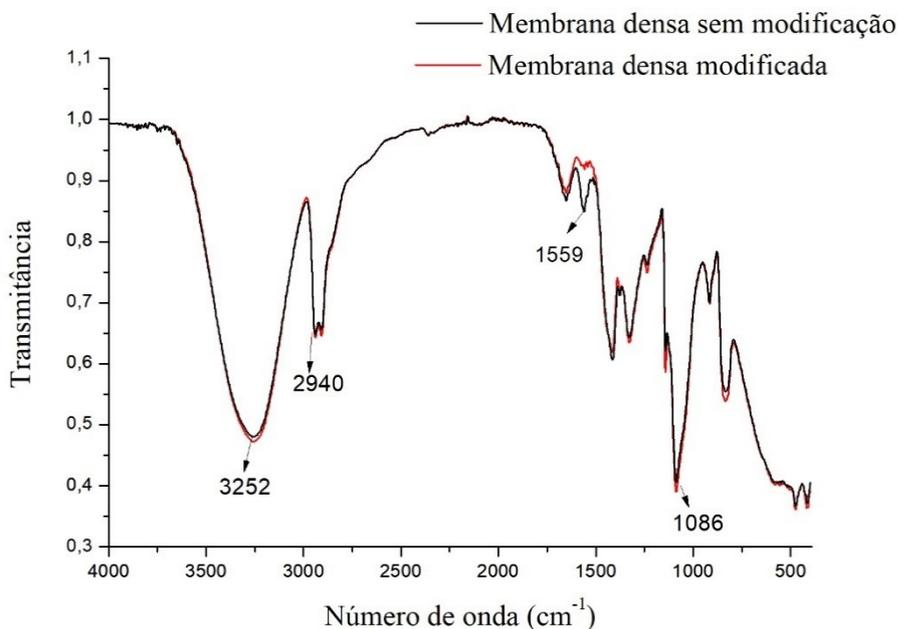


Figura 25- Espectro no infravermelho para as membranas densas sem modificação adicional e modificada.

As bandas de vibração na faixa de $3200\text{-}3550\text{ cm}^{-1}$ são devidas às ligações O-H intra ou inter moleculares (REIS et al., 2006). Em ambos os espectros, as bandas largas centradas em aproximadamente 3550 cm^{-1} caracterizam os grupos hidroxilas presentes na membrana. Esses grupos são oriundos do PVA.

A banda vibracional observada entre 2840 e 3000 cm^{-1} refere-se às vibrações dos grupos alquil C-H, típicos dos compostos orgânicos e a banda vibracional na faixa de 1085 a 1150 cm^{-1} é devido às ligações C-O-C devido a formação do anel de acetal, produto da reação de reticulação entre o PVA e o GA (MANSUR et al., 2008).

A ausência do pico na faixa de número de onda de 1735 a 1750 cm^{-1} devido ao grupo carbonila (C=O), típico de aldeído, sugere que todos grupos de aldeído do glutaraldeído reagiram com os grupos O-H do PVA (REIS et al., 2006).

Não foi possível identificar grupos específicos do azul de Coomassie brilhante.

5.3.5 Teste de dessorção da BSA da membrana

Pelo teste de carga zero da membrana densa, foi possível verificar que tanto a membrana como a BSA apresentavam-se carregadas negativamente e que a interação entre elas provavelmente não foi eletrostática. Tendo em vista esse resultado, optou-se por realizar a dessorção em um pH que pudesse desfavorecer essa interação fraca, mas que estivesse dentro da faixa de pH ótimo da proteína. A proposta foi aumentar o pH de forma que a BSA e a membrana ficassem mais negativas e isso pudesse favorecer a repulsão. O pH escolhido para tal, foi o pH 8,0. Em um teste preliminar feito na mesma temperatura que a adsorção, não foi possível detectar a presença de proteína dessorvida, por isso optou-se por aumentar até 45°C, dentro da faixa ótima de atividade proteolítica da bromelina.

O resultado obtido é exibido na Tabela 7.

Tabela 7- Resultados para o teste de dessorção.

Concentração inicial da solução antes da adsorção (mg/mL)	0,1280
Concentração da solução após adsorção (mg/mL)	0,1076
Massa de BSA adsorvida (mg) por grama de membrana	1,7
Massa de BSA dessorvida (mg) por grama de membrana	1,3

Conforme pode ser verificado da Tabela 7, foi possível dessorver 76% da quantidade de BSA adsorvida utilizando essa condição de dessorção.

Shamim et al. (2006) estudaram a dessorção da BSA em nanopartículas magnéticas revestidas com polímero termossensível sob condições alcalinas. Eles verificaram que mais de 80% da proteína poderia ser dessorvida das partículas quando a dessorção era conduzida em

temperatura próxima a 30°C e que aproximadamente 60% de BSA era dessorvida quando o processo ocorria próximo a 40°C.

He, Gan e Sun (1997) estudaram a adsorção de BSA em um substrato impregnado com o corante azul de Cibacron e mostraram que a adsorção foi totalmente reversível e Anirudhan, Tharum e Rejeena (2011) investigaram a adsorção/dessorção de BSA em um composto bentonítico e verificaram que quase 99,2% de BSA poderia ser dessorvida usando 0,1 M de Na₂CO₃, com força iônica de 0,3 M. No presente trabalho, utilizou-se solução NaOH para dessorver com concentração baixa, força iônica de 1x10⁻⁶ mol/L.

Zhang et al. (2016) estudaram a adsorção e dessorção de BSA em microesferas magnéticas modificadas com azul de Cibacron e verificaram que a capacidade adsortiva foi pequena em pH 8,0. Devido a isso, escolheram este pH como condição para experimentação e as taxas de dessorção foram superiores a 90%.

5.3.6 Adsorção e dessorção de bromelina

Nesse teste foi possível avaliar a adsorção e dessorção da bromelina em termos de proteína total, assim como avaliar a perda da atividade enzimática em cada etapa. Para tal, mediu-se a concentração de tirosina liberada pela bromelina em cada processo. A curva de calibração utilizada para essa quantificação é apresentada no Apêndice B. A Tabela 8 resume os resultados em cada etapa.

Tabela 8- Resultados para o teste de adsorção e dessorção da bromelina.

Solução	Massa de bromelina adsorvida (mg) por massa de membrana (g)	Massa de bromelina dessorvida (mg) por massa de membrana (g)	Atividade enzimática (U/mL)	Atividade enzimática específica (U/mg)
Inicial	1,7	---	24,69	76,7
Após adsorção		0,1	24,54	81,4
Após dessorção	---			1,32

Foi possível verificar dos resultados da Tabela 8 que, utilizando-se as mesmas condições da dessorção da BSA, consegue-se dessorver apenas 6% da bromelina, com redução da atividade enzimática em U/mL. No entanto, ao se calcular a atividade enzimática específica, verifica-se que essa aumenta de forma muito significativa de 76,7 para 989,1 U/mg, indicando

que a quantidade de bromelina desorvida é muito pequena, mas que essa parcela desorvida apresenta expressiva atividade.

Esse aumento considerável na atividade específica ocorre pois a concentração proteica medida na amostra após desorção foi pequena, fazendo com que U/mg fosse um número grande. Uma justificativa para isso pode ser a influência do polietilenoglicol (PEG), que provavelmente está presente nas amostras inicial e após adsorção, na análise de Bradford. Nessas amostras, o PEG pode ter contribuído para a análise de proteína, e no caso da amostra após adsorção, somente proteína foi medida, de fato, fazendo-se com que a concentração proteica mensurada fosse pequena.

Para aplicações na indústria alimentícia, a bromelina é comercializada com atividade enzimática específica de 750 a 1600 (unidade de digestão de caseína)/mg de proteína (NOR et al., 2015).

Pelo fato da bromelina se ligar, provavelmente, com a membrana de forma eletrostática, pode-se supor que a condição empregada não foi suficiente para a desorção. Até porque, a bromelina do caule tem ponto isoelétrico de 9,55 e o pH empregado foi de 8,0, ou seja, nesse pH a bromelina do caule continua positiva enquanto a membrana está muito negativa.

Chen e Huang (2004) estudaram a desorção da bromelina de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro pelo aumento da força iônica do meio. De acordo com esses autores, o aumento da força iônica poderia reduzir a atração eletrostática entre as partículas carregadas negativamente e as moléculas de bromelina carregadas positivamente. No pH 7,0 na presença de KCl com concentração acima de 0,6 M conseguiram desorver praticamente toda a bromelina com recuperação de 87,4% da atividade.

Comparando-se os resultados obtidos para a membrana densa e porosa, observa-se que os melhores resultados de adsorção de bromelina também foram obtidos para a membrana porosa, justificado pela presença de poros dessa membrana que aumentam os sítios de adsorção. No entanto, os dois tipos de membranas apresentam potencial para serem utilizadas como membranas de afinidade em aplicações distintas.

6. CONCLUSÕES

Nesse trabalho propôs-se uma metodologia para a modificação superficial de uma membrana comercial porosa de policarbonato e uma membrana densa de PVA e estudou-se a adsorção de BSA e bromelina nessas membranas. As principais conclusões obtidas a partir dos resultados deste trabalho foram:

- A temperatura de secagem escolhida para o revestimento de PVA foi a ambiente (26°C), tendo em vista a simplicidade desse processo e pela indicação do FTIR. No entanto, é importante ressaltar que o aumento de sinal na secagem à temperatura ambiente pode ser devido também à presença de água;
- A menor concentração de GA foi escolhida como melhor concentração no desenvolvimento das membranas com o intuito de se evitar a formação de oligômeros de GA em concentrações mais elevadas e por ser àquela em que foi possível observar a adsorção da proteína;
- As reduções da permeabilidade hidráulica nas membranas porosas modificadas indicaram que, de alguma forma, a superfície das membranas foi alterada pela deposição de material;
- O FTIR na membrana porosa confirmou a presença de grupos do policarbonato e o menor pico devido o grupo carbonila na membrana modificada indicou que parte dos grupos carbonila podem ter reagido com os grupos hidroxila do PVA. Já o FTIR para a membrana densa confirmou a presença de grupos típicos do PVA e confirmou a formação do anel de acetal, produto da reticulação do PVA e do GA;
- O MEV das membranas porosa e densa mostrou os poros cilíndricos típicos da membrana de policarbonato e indicou, pela ausência de poros na amplitude usada, a síntese da membrana densa de PVA;
- A maior adsorção de bromelina ocorreu em pH 6,5;
- Em sistema contínuo, foi possível adsorver 67,71 mg de BSA por grama de membrana, resultado inferior em termos de adsorção ao obtido pela literatura, mas significativo tendo em vista que foi usado materiais e reagentes mais baratos e acessíveis;
- O teste de adsorção de BSA na membrana densa mostrou que a modificação superficial aumentou em 76% a adsorção da proteína;

- O ponto de carga zero da membrana densa mostrou que a interação predominante entre a BSA não poderia ser eletrostática tendo em vista que ambos apresentam carga superficial negativa no pH testado, mas indicou que poderia ser se a bromelina utilizada fosse a da fruta;
- Foi possível dessorver 76% da BSA em membrana densa em pH 8,0 a 45°C;
- Foi possível dessorver apenas 6 % da bromelina em membrana densa, mas essa parcela dessorvida apresentou aumento expressivo na atividade enzimática específica, indicando que a bromelina foi separada e concentrada no extrato final;
- As duas membranas de afinidade desenvolvidas, densa e porosa, apresentam potencial para serem usadas em diferentes sistemas. No caso da membrana porosa, essa poderia ser usada na separação de bromelina em estágios mais iniciais do processo (como microfiltração), enquanto a membrana densa poderia ser aplicada na diálise de proteínas após duas etapas de ultra (de 100 e de 3kDa).

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

As seguintes questões são sugeridas para trabalhos posteriores:

- Realizar os testes de adsorção utilizando bromelina proveniente de extrato de abacaxi;
- Investigar mais a influência da temperatura na imobilização do corante na membrana;
- Avaliar o ponto de carga zero da membrana porosa;
- Investigar a influência do pH na adsorção de BSA;
- Melhorar, automatizar o sistema contínuo para que seja possível avaliar as condições operacionais, como influência da pressão;
- Realizar estudo cinético e determinar as isotermas de adsorção do sistema membrana de afinidade porosa/bromelina, BSA, membrana de afinidade densa/bromelina, BSA.
- Repetir o teste de dessorção de bromelina tendo em vista a elevada atividade enzimática observada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-GHANI, N.T. et al. Adsorption of coomassie brilliant blue R-250 dye onto novel activated carbon prepared from *Nigella Sativa* L. waste: Equilibrium, kinetics and thermodynamics, **J. Chil. Chem. Soc.**, v. 62, p. 3505- 3511, 2017.
- AKGÖL, S. et al. Glucose oxidase and catalase adsorption onto Cibacron Blue F3GA- attached microporous polyamide hollow-fibres. **Reactive & Functional Polymers**, v. 55, p. 45-51, 2003.
- AKRAM, M. et al. Probing interaction of bovine serum albumin (BSA) with the biodegradable version of cationic gemini surfactants, **Journal of Molecular Liquids**, v. 276, p. 519-528, 2019.
- AMID, A. et al. Expression, purification, and characterization of a recombinant stem bromelain, **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2232-2239, 2011.
- ANGELINI, J.M.G. **Estudo de Tensões Residuais em Policarbonato Moldado por Injeção. 1999.** 119f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.
- ANIRUDHAN, T.S.; THARUN, A.R.; REJEENA, S.R. Investigation on Poly(methacrylic acid)- Grafted Cellulose/ Bentonite Superabsorbent Composite: Synthesis, Characterization, and Adsorption Characteristics of Bovine Serum Albumin. **Ind. Eng. Chem. Res**, v.50, p. 1866-1874, 2011.
- ARANHA, I.B.; LUCAS, E.F. Poli (Álcool Vinílico) Modificado com Cadeias Hidrocarbônicas: Avaliação do Balanço Hidrófilo/ Lipófilo, **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, p. 174-181, 2001.
- ARAÚJO, K.G.L. et al. Utilização de abacaxi (*Ananas comosus* L.) cv. Pérola e Smooth cayenne para a produção de vinhos- estudo da composição química e aceitabilidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 56-61, 2009.
- ARSHAD, Z.I.M. et al. Bromelain: an overview of industrial application and purification strategies, **Appl. Microbiol Biotechnol**, v. 98, p. 7283-7297, 2014.
- ARUMUGAM, A.; PONNUSAMI, V. Pineapple fruit bromelain recovery using recyclable functionalized ordered mesoporous silica synthesized from sugarcane leaf ash. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.30, p. 477-486, 2013.
- BABU, B.R.; RASTOGI, N.K.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Liquid-liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system, **Chemical Engineering and Processing**, v. 47, p. 83-89, 2008.
- BAGOJI, A.M. et al. Characterization of the binding and conformational changes of bovine serum albumin upon interaction with antihypertensive Olmesartan medoxomil, **Journal of Molecular Structure**, v. 1179, p. 269-277, 2019.

BALA, M. et al. Bromelain production: Current trends and perspective, **Archives des Sciences**, v. 65, p. 369-399, 2012.

BALA, M. et al. Kinetic studies on recombinant stem bromelain, **Advances in Enzyme Research**, v. 1, p. 52-60, 2013.

BAUMANN, L. et al. Tuning the resistance of polycarbonate membranes by plasma-induced graft surface modification, **Applied Surface Science**, v. 268, p. 450-457, 2013.

BEHBOUDI, A.; JAFARZADEH, Y.; YEGANI, R. Polyninyl chloride/ polycarbonate blend ultrafiltration membranes for water treatment, **Journal of Membrane Science**, v. 534, p. 18-24, 2017.

BERNELA, M., AHUJA, M., THAKUR, R. Enhancement of anti-inflammatory activity of bromelain by its encapsulation in katira gum nanoparticles, **Carbohydrate Polymers**, v. 143, p. 18-24, 2016.

CAMPOS, D.A. et al. Optimization of bromelain isolation from pineapple byproducts by polysaccharide complex formation, **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 792-804, 2019.

CAMPOS, D.A. et al. Platform design for extraction and isolation of Bromelain: Complex formation and precipitation with carrageenan, **Process Biochemistry**, v. 54, p. 156-161.

CAO, Y.; ZHAO, J.; XIONG, Y.L. Coomassie Brilliant Blue-binding: a simples and effective method for the determination of water-insoluble protein surface hydrophobicity, **Analytical Methods**, v.8, p. 790-795, 2016.

CARLSSON, N.; KITTS, C.C.; AKERMAN, B. Spectroscopic characterization of Coomassie blue and its binding to amyloid fibrils, **Analytical Biochemistry**, v. 420, p. 33-40, 2012.

CARVALHO, L.H. et al. Efeitos das Condições de Preparação e de Modificação de Superfície de Membranas de PEUAPM na Separação Água/Óleo, **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, p. 72-78, 2009.

CHAURASIYA, R.S.; HEBBAR, H.U. Extraction of bromelain from pineapple core and purification by RME and precipitation methods. **Separation and Purification Techology**, v. 111, p. 90-97, 2013.

CHEN, D-H.; HUANG, S-H. Fast separation of bromelain by polyacrylic acid-bound iron oxide magnetic nanoparticles. **Process Biochemistry**, v.39, p. 2207-2211, 2004.

CHEN, F.R.; CHEN, H.F. Pervaporation separation of ethylene glycol-water mixtures using crosslinked PVA-PES composite membranes. Part I. Effects of membrane preparation conditions on pervaporation performances, **Journal of Membrane Science**, v. 109, p. 247-256, 1996.

COELHO, D.F., SILVEIRA, E., TAMBOURGI, E.B. Purification Processes and Market Potential of Bromelain in Brazil, **J. Chem. Chem. Eng**, v. 8, p. 882-888, 2014.

ÇÖKELILER, D. Enhancement of polycarbonate membrane permeability due to plasma polymerization precursors, **Applied Surface Science**, v. 268, p. 28-36, 2013.

CORSO, C.A.; WALISZEWSKI, K.N.; WELTI-CHANES, J. Pineapple fruit bromelain affinity to different protein substrates, **Fruit Chemistry**, v.133, p. 631-635, 2012.

COSTA, A.C.M. **Desenvolvimento de membranas de osmose inversa resistentes à deposição de matéria orgânica e bioincrustações**. 2009. 122f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

COSTA, H.B. et al. A new procedure based on column chromatography to purify bromelain by ion exchange plus gel filtration chromatographies, **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 163-168, 2014.

CRESTANI, M. et al. Das Américas para o mundo- origem, domesticação e dispersão do abacaxizeiro. **Ciência rural**, v.40, p. 1473-1483, 2010.

DELAVAR, M.; BAKERI, GH.; HOSSEINI, M. Fabrication of polycarbonate mixed matrix membranes containing hydrous manganese oxide and alumina nanoparticles for heavy metal decontamination: Characterization and comparative study, **Chemical Engineering Research and Design**, v. 120, p. 240-256, 2017.

DIEL, J.L. **Caracterização funcional de membranas cerâmicas de micro e ultrafiltração**. 2010. 131f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

DOKO, M.B. et al. Preparation of proteolytic enzyme extracts from *Ananas comosus* L., Merr. fruit juice using semipermeable membrane, ammonium sulfate extraction, centrifugation and freeze-drying processes, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 76, p. 199-206, 1991.

DOSSA, D., FUCHS, F. Abacaxi: Produção, mercado e preços na CEASA-PR, 2017. Disponível em <http://www.ceasa.pr.gov.br/arquivos/File/BOLETIM/Informe_Tecnico_Abacaxi.pdf> Acesso em: Novembro de 2017.

DUONG-LY, K.; GABELLI, S.B. Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation, **Methods in Enzymology**, v. 541, p. 85-94, 2014.

EL ATMANI, E.H. et al. The oriented processes for extraction and recovery of paracetamol compound across different affinity polymer membranes. Parameters and mechanisms, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 126. P. 201-210, 2018.

ELPÍDIO, C.M.A. **Síntese e caracterização de adsorvente pelicular para Adsorção em Leito Expandido (ALE)**. 2016. 89f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016.

FERREIRA, J.F. et al. Purificação da enzima bromelina presente no curauá (*Ananas erectifolius* L.B. SMITH) variedade roxa, por sistema bifásico aquoso PEG 4000/fosfato de potássio, **Revista brasileira de produtos agroindustriais**, v.13, p.197-202, 2011.

FIGUEIREDO, K.C.S. **Desenvolvimento de membrana com mioglobina para a permeação seletiva de oxigênio**. 2008. 212 f. Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

FIGUEIREDO, K.C.S.; ALVES, T.L.M.; BORGES, C.P. Poly(vinyl alcohol) Films Crosslinked by Glutaraldehyde Under Mild Conditions. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 111, p. 3074- 3080, 2008.

GIL, L.S.; MAUPOEY, P.F. An integrated approach for pineapple waste valorization. Bioethanol production and bromelain extraction from pineapple residues. **Journal of Cleaner Production**, v. 172, p. 1224- 1231, 2018.

GRANADA, G.G.; ZAMBIAZI, R.C.; MENDONÇA, C.R.B. Abacaxi: produção, mercado e subprodutos. **B. CEPPA**, v.22, n.2, p.405-422, 2004.

GUIMARÃES, A.R. **A produção de abacaxi: estratégias de reprodução da agricultura familiar no município de Monte Alegre de Minas (MG)**. 2015. 152f. Dissertação (Mestrado em Geografia) - Universidade Federal de Goiás, Catalão, 2015.

GUIMARÃES, J.A. et al. Membranas poliméricas modificadas com biocidas naturais para evitar a formação de bioincrustações. In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2015, Florianópolis, Santa Catarina, Blucher Chemical Engineering Proceedings, Volume 1, 2015, p. 14813-14820.

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

HAN, J. et al. Preparation of temperature-sensitive magnetic microspheres for separation and purification of bromelain. **Food and Bioprocess Processing**, v. 114, p. 253- 262, 2019.

HASSAN, A. et al. Development of Anti-bacterial PVA/ Starch Based Hydrogel Membrane for Wound Dressing, **J Polym Environ**, v. 26, p. 235-243, 2018.

HE, L.-Z.; GAN, Y.-R.; SUN, Y. Adsorption-desorption of BSA to highly substituted dye-ligand adsorbent: quantitative study of the effect of ionic strength, **Bioprocess Engineering**, v. 17, p. 301-305, 1997.

HE, L.Z.; GAN, Y.R.; SUN, Y. Adsorption-desorption of BSA to highly substituted dye-ligand adsorbent: quantitative study of the effect of ionic strength. **Bioprocess Engineering**, v.17, p.301-305, 2010.

HE, M.; WANG, C.; WEI, Y. Preparation of a novel Zr^{4+} -immobilized metal affinity membrane for selective adsorption of phosphoprotein, **Journal of Chromatography B**, v. 1029- 1030, p. 184-190, 2016.

HEBBAR, U.H.; SUMANA, B.; HEMAVATHI, A.B. Separation and Purification of Bromelain by Reverse Micellar Extraction Coupled Ultrafiltration and Comparative Studies with Other Methods, **Food Bioprocess Technol.**, v. 5, p. 1010-1018, 2012.

HONJO, T. Preparation of affinity membranes using thermally induced phase separation for one-step purification of recombinant proteins, **Analytical Biochemistry**, v. 434, p. 269-274, 2013.

HOSSAIN, MD. F.; AKHTAR, S.; ANWAR, M. Nutritional value and medicinal benefits of pineapple. **International Journal of Nutrition and Food Sciences**, v. 4, p. 84-88, 2015.

IBGE. Levantamento sistemático da produção agrícola, 2017. Disponível em:< [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Fasciculo/2017/lspa_201712.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/2017/lspa_201712.pdf)> Acesso em Abril de 2019.

INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ. Santa Helena mostra alternativas do abacaxi e pesquisa com bromelina, 2016. Disponível em:< <http://www.iapar.br/2016/10/2038/Santa-Helena-mostra-alternativas-do-abacaxi-e-pesquisa-com-bromelina-.html>> Acesso em Novembro de 2017.

ISHAK et al. Recent progress in the hydrophilic modification of alumina membranes for protein separation and purification, **Ceramics International**, v. 43, p. 915-925, 2017.

KAMPS, J.H. et al. Functional polycarbonates for improved adhesion to carbon fibre. **Composites Science and Technology**, v. 167, p. 448-455, 2018.

KETNAWA, S.; CHAIWUT, P.; RAWDKUEN, S. Pineapple wastes: a potential source for bromelain extraction, **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 385-391, 2012.

KIM, K.J. et al. Chemical and electrical characterization of virgin and protein-fouled polycarbonate track-etched membranes by FTIR and streaming-potential measurements. **Journal of Membrane Science**, v. 134, p. 199- 208, 1997.

KLEIN, E. Affinity membranes: a 10-year review. **Journal of Membrane Science**, v. 179, p. 1-27, 2000.

KOH, B-B. et al. Characterization of bovine sérum albumin hydrolysates prepared by subcritical water processing, **Food Chemistry**, v. 278, p. 203-207, 2019.

KONOVALOVA, V. et al. Enhanced starch hydrolysis using α -amylase immobilized on cellulose ultrafiltration affinity membrane, **Carbohydrate Polymers**, v. 152, p. 710-717, 2016.

LEITE, N.S. et al. Determination of Optimal Condition to Obtain the Bromelain from Pineapple Plants Produced by Micropropagation, **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, p. 647-652, 2012.

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

LI, F. et al. Surface modification of ultrafiltration membranes by grafting glycine-functionalized PVA based on polydopamine coatings, **Applied Surface Science**, v. 345, p. 301-309, 2015.

LIMA, G.A.; SANTANA, M.F.; SOUZA, R.R. Otimização do processo de recuperação e concentração da bromelina utilizando membranas cerâmicas, **Scientia Plena**, v. 5, p. 1-5, 2009.

LIMA, P.C.C. et al. Aproveitamento agroindustrial de resíduos provenientes do abacaxi Pérola minimamente processado, **Holos**, v.2, p. 122-136, 2017.

LIN, L. et al. Novel affinity membranes with macrocyclic spacer arms synthesized via click chemistry for lysozyme binding, **Journal of Hazardous Materials**, v. 327, p. 97-107, 2017.

LIU, Z. et al. Effect of Postcrosslinking Modification with Glutaraldehyde on the Properties of Thermoplastic Starch/Poly(vinyl alcohol) Blend Films, **Journal of Applied Polymer Science**, v. 124, p. 3774-3781, 2012.

LOPES, F.L.G. et al. Concentration by membrane separation processes of a medicinal product obtained from pineapple pulp. **Brazilian archives of biology and technology** v. 52, p. 457-464, 2009.

MACÊDO, M.O.C. et al. Estudo comparativo da modificação superficial de membranas de quitosana tratadas por plasma de oxigênio, nitrogênio e hidrogênio, **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 7, p. 95-103, 2012.

MANSUR, H.S. et al. FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. **Materials Science and Engineering C**, v. 28, p.539-548, 2008.

MARQUES, M.S. **Influência da modificação química de superfície de óxidos de ferro na adsorção de cádmio e chumbo**. 2009. 54f. Dissertação (Mestrado em *Scientiae*) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

MEHTA, B.B.; JOSHI, R.N.; RAVAL, H.D. A novel ultra-low energy reverse osmosis membrane modified by chitosan with glutaraldehyde crosslinking, **Journal of Applied Polymer Science**, v. 45971, p. 1-7, 2018.

MONTEIRO, M.M. **Preparação e caracterização de filmes poliméricos a partir de Álcool Polivinílico (PVA)/Metilcelulose (MC) para a liberação controlada do agroquímico Terbutilazina**. 2017. 37f. Monografia (Bacharelado em Química) – Faculdade de Ciências Integradas no Pontal, Universidade Federal de Uberlândia, Ituiutaba, 2017.

MURACHI, T., TAKAHASHI, N. In: DESNUELLE, P., NEURATH, H., OTTESEN, M. **Structure- Function Relationships of Proteolytic Enzyme**. New York: Academic Press, 1969.

NADZIRAH, K.Z. et al. Efficacy of selected purification techniques for bromelain, **Internacional Food Research Journal**, v. 20, p. 43-46, 2013.

NAKAMURA, K., ORIME, T., MATSUMOTO, K. Response of zeta potential to cake formation and pore blocking during the microfiltration of latex particles. **Journal of Membrane Science**, v. 401-402, p. 274-281, 2012.

NAKTHONG, N.; WONGSAGONSUP, R.; AMORNSAKCHAI, T. Characteristics and potential utilizations of starch from pineapple stem waste. **Industrial Crops & Products**, v. 105, p. 74-82, 2017.

NGADIMAN, N.H.A. et al. Influence of polyvinyl alcohol molecular weight on the electrospun nanofiber mechanical properties, **Procedia Manufacturing**, v. 2, p. 568-572, 2015.

NIEHUES, E. **Elaboração e Caracterização de Membranas de Gelatina Eletrofiadas e Modificadas por Gultaraldeído ou Nanocristais de Celulose**. 2015. 91f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2015.

- NOGUEIRA, F.T. **Síntese e caracterização de membranas de filme fino composto de polissulfona/quitosana reticulada com glutaraldeído**. 2012. 205f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- NOR, M.Z.M. et al. Application of membrane-based technology for purification of bromelain, **International Food Research Journal**, v. 24, p.1685-1696, 2017a.
- NOR, M.Z.M. et al. Characteristic properties of crude pineapple waste extract for bromelain purification by membrane processing, **Food and Bioproducts Processing**, v. 52, p. 7103-7112, 2015.
- NOR, M.Z.M. et al. Integrated ultrafiltration process for the recovery of bromelain from pineapple waste mixture, **Journal of Food Process Engineering**, v. 40, p.1-9, 2017b.
- NOR, M.Z.M. et al. Separation of bromelain from crude pineapple waste mixture by a two-stage ceramic ultrafiltration process, **Food and Bioproducts Processing**, v. 98, p.142-150, 2016.
- NOSRATI, H. et al. Bovine serum albumin: An efficient biomacromolecule nanocarrier for improving the therapeutic efficacy of chrysin, **Journal of Molecular Liquids**, v. 271, p. 639-646, 2018.
- NOVAES, L.C.L. et al. Stability, Purification, and Applications of Bromelain: A Review, **Biotechnol. Prog.**, v. 32, p. 5-13, 2016.
- OGATA, Y. Affinity Separation of Lectins Using Porous Membranes Immobilized with Glycopolymer Brushes Containing Mannose or N-Acetyl-D-Glucosamine, **Membranes**, v. 3, p. 169-181, 2013.
- ORÉFICE, R.L.; VASCONCELOS, W.L.; MORAES, M.A.S. Estabilidade de Fases em Blendas de Policarbonato- Poliestireno Avaliada por Micro-FTIR, Análise Térmica e Microscopia Eletrônica de Varredura. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 14, p. 129- 133, 2004.
- ORSOLETTA, G.D. **Aproveitamento tecnológico da casca de amendoim em processo de biossorção de corante têxtil**. 2017. 91f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2017.
- PARK, J.; KIM, S. Anti-biofouling enhancement of a polycarbonate membrane with functionalized poly(vinyl alcohol) electrospun nanofibers: Permeation flux, biofilm formation, contact, and regeneration tests, **Journal of Membrane Science**, v. 540, p.192-199, 2017.
- PARSHIN, A.M. et al. Domain Structures in Nematic Liquid Crystals on a Polycarbonate Surface. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 16303-16320, 2013.
- PAVAN, R. et al. Properties and Therapeutic Application of Bromelain: A Review, **Biotechnology Research International**, v. 2012, p. 1-6, 2012.
- POLYAKOV, Y.S., ZYDNEY, A.L. Ultrafiltration membrane performance: Effects of pore blockage/ constriction, **Journal of Membrane Science**, v. 434, p. 106-120, 2013.
- QUEIROZ, C.F.O. **Estudos sobre a intercalação dos corantes azul brilhante- FCF e azul de coomassie G-250 em ácido desoxirribonucleico (DNA)**. 2007. 118f. Dissertação

(Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

RAGHUPATHY, V.; OOMMEN, A.; RAMACHANDRAN, A. Dimethylformamide interferes with Coomassie dye staining of proteins on blue native gel electrophoresis, **Analytical Biochemistry**, v. 455, p. 1-2, 2014.

RAMLÍ, A.N.M., AZNAN, T.N.T., ILLIAS, R.M. Bromelain: from production to commercialization, **J Sci Food Agri**, v. 97, p. 1386-1395, 2017.

REINHARDT, D.H., SOUZA, L.F.S., CABRAL, J.R.S. Abacaxi. Produção- Aspectos técnicos. Embrapa Agroindústria de alimentos. Brasília: Embrapa Comunicações para Transferência de Tecnologia, 45 p., 2000.

REIS, E.F. et al. Synthesis and Characterization of Poly (Vinyl Alcohol) Hydrogels and Hybrids for rMPB70 Protein Adsorption. **Materials Research**, v. 9, p.185-191, 2006.

REIS, S.G. **Síntese a avaliação biológica de aminas e aminoácidos aromáticos e heteroaromáticos**. 2012. 102f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.

RIBEIRO, L.M.S. **Aproveitamento de subprodutos do processamento de abacaxi**. 2015. 93f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar- Processamento de Alimentos) - Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2015.

RODRIGUES, V.N. et al. Elaboração e caracterização sensorial de licor de abacaxi. In: XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Gramado/RS, 2016.

ROWAN, A. Stem bromelain. In: RAWLINGS, N., SALVESEN, G. **Handbook of proteolytic enzymes**. Academic Press, p. 1871- 1873, 2012.

SAEKI, D., MINAMI, R., MATSUYAMA, H. Effects of operating conditions on biofouling in crossflow ultrafiltration membrane processes, **Separation and Purification Technology**, v. 189, p. 138-144, 2017.

SCHIMMEL, D. **Adsorção dos corantes reativos azul 5G e azul turquesa QG em carvão ativado comercial**. 2008. 83f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2008.

Search SWISS-MODEL REPOSITORY. Disponível em <https://swissmodel.expasy.org/repository>. Acesso em 10 de dezembro de 2017.

SECRETARIA DE ESTADO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO DE MINAS GERAIS. Abacaxi. Disponível em www.agricultura.mg.gov.br .Acesso em 07 de dezembro de 2017.

SHAMIM, N. et al. Thermosensitive-polymer-coated magnetic nanoparticles: Adsorption and desorption of Bovine Serum Albumin. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 304, p. 1-8, 2006.

SHEKHAWAT, N.; SHARMA, A.; AGGARWAL, S. Refractive index engineering in polycarbonate implanted by 100 keV^{N+} ions. **Optical Engineering**, v. 50, 2011.

SILVA, F.V.; SANTOS, R.L.A.; FILETI, A.M.F. Adaptive control of bromelain precipitation in a fed-batch stirred tank. In: International Symposium on Advanced Control of Chemical Processes, Gramado, Brazil, 2006.

SILVA, O.S. et al. Partitioning and extraction protease from *Aspergillus tamari* URM4634 using PEG-citrate aqueous two-phase systems, **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, p. 168-173, 2017.

SILVESTRE, M.P.C. et al. Effect of pH and temperature on the activity of enzymatic extracts from pineapple peel. **Food Bioprocess Technol**, v.5, p. 1824-1831, 2012.

SIMÕES, A.L.A. et al. **Comparação e integração de processos de extração via sistema aquoso bifásico e ultrafiltração na recuperação da bromelina presente no resíduo do abacaxi (*Ananas comosus*)**. 2017. 92 p. Monografia (Engenharia Química) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.

SITI ROCHA, A.M. et al. Determination of sugar content in pineapple waste variety N36. **International Food Research Journal**, v. 20, p. 1941-1943, 2013.

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

SOUZA, G.R., SILVA, A.A., CARREIRA, R.L., SILVESTRE, M.P.C. Obtenção de bromelina e caracterização da atividade proteolítica visando a sua utilização na produção de suplemento dietético para fenilcetonúricos, 2005.

SUN, W.; SHEN, H.; CAO, J. Modification of wood by glutaraldehyde and poly(vinyl alcohol), **Materials and Design**, v. 96, p. 392-400, 2016.

TAP, F.M.; MAJID, F.A.A.; KHAIRUDIN, N.B.A. Structure prediction of Stem Bromelain from pineapples (*Ananas Comosus*) using procaricain enzyme as a modelling template, **International Journal of Applied Engineering Research**, v. 9, p. 6109-6111, 2016.

THIVYA, P.; WILSON, J. Electron rays irradiated polyaniline anchored over bovine serum albumin for simultaneous detection of epinephrine and uric acid, **Microchemical Journal**, v. 145, p. 883-891, 2019.

THONG, C.C; TEO, D.C.L.; NG, C.K. Application of polyvinyl alcohol (PVA) in cement-based composite materials: A review of its engineering properties and microstructure behavior, **Construction and Building Materials**, v. 107, p. 172-180, 2016.

TU, C-Y. et al. Surface grafting polymerization and modification on poly(tetrafluorethylene) films by means of ozone treatment, **Polimer**, v. 46, p. 6976-6985, 2005.

VARNIER, K. et al. Polysaccharide-based hydrogels for the immobilization and controlled release of bovine serum albumin, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 522-528, 2018.

WANG, W. et al. Amine-functionalized PVA-co-PE nanofibrous membrane as affinity membrane with high adsorption capacity for bilirubin, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 150, p. 271-278, 2017.

WEI, Y-J.; LI, K-A.; TONG, S-Y. A linear regression method for the study of the Coomassie brilliant blue protein assay, **Talanta**, v. 44, p. 923-930, 1997.

WU, W. et al. Single step purification of bromelain from *Ananas comosus* pulp using a polymer/salt aqueous biphasic system, **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 79, p. 158-162, 2017.

XU, X. et al. Fabrication of a novel magnetic mesoporous molecularly imprinted polymer based on *pericarpium granati*- derived carrier for selective absorption of bromelain, **Food Chemistry**, v. 256, p. 91-97, 2018.

YAMIN, M. et al. Synergism between high hydrostatic pressure and glutaraldehyde for the inactivation of *Staphylococcus aureus* at moderate temperature, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 8341-8350, 2018.

YIN, L. et al. Preparative purification of bromelain (EC 3.4.22.33) from pineapple fruit by high-speed counter-current chromatography using a reverse-micelle solvent system, **Food Chemistry**, v. 129, p. 925-932, 2011.

YUAN, S. et al. Structure-affinity relationship of the binding of phenolic acids and their derivatives to bovine serum albumin, **Food Chemistry**, v. 278, p. 77-83, 2019.

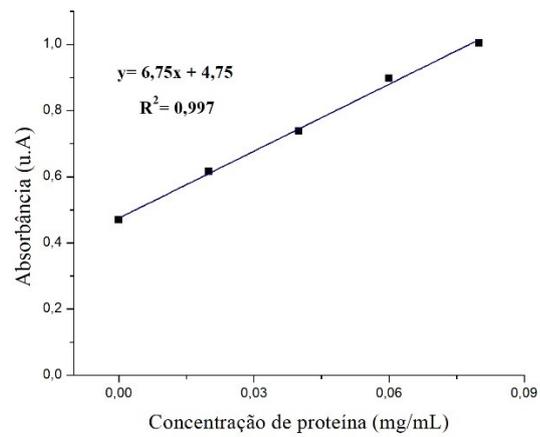
ZHANG, D-H. et al. Effects of different spacer arms on Cibacron Blue modification and protein affinity adsorption on magnetic microspheres, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 113, p. 136-143, 2016.

ZHANG, H. et al. Surface modification of electrospun polyacrylonitrile nanofiber towards developing an affinity membrane for bromelain adsorption. **Desalination**, v. 256, p. 141-147, 2010.

ZHANG, L-Z. et al. Synthesis and characterization of a PVA/LiCl blend membrane for air dehumidification, **Journal of Membrane Science**, v. 308, p. 198-206, 2008.

APÊNDICE

Apêndice A- Curva de calibração para a quantificação de proteína total pelo método de Bradford.



Apêndice B- Curva de calibração para a quantificação da atividade enzimática.

