



ADSORÇÃO DA ENZIMA PEROXIDASE DE FARELO DE ARROZ EM RESINAS DE TROCA IÔNICA

S. S. Fernandes¹; G.V. Gautério¹; F. O. Molon¹; F. S. Figueira¹; J. G. Buffon¹; S.J. Kalil^{1*}

1- Escola de Química e Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande
Avenida Itália km 8, Bairro Carreiros, s/n – CEP: 96201-900– Rio Grande – RS – Brasil
Telefone: (53) 3233-6960 – Fax: (53) 3233-8644 – *E-mail: dqmsjk@furg.br

RESUMO: A enzima peroxidase catalisa a oxidação de elétrons de uma variedade de compostos oxidáveis usando o peróxido de hidrogênio como molécula aceptora. Entre os métodos empregados na purificação de enzimas, tem-se a cromatografia de troca iônica em leito expandido, a qual oferece vantagens de maior produtividade e rendimento global. Este trabalho visou o estudo da adsorção em diferentes resinas de troca iônica aplicáveis em coluna de leito expandido, bem como a definição das melhores condições de pH a serem empregadas para a posterior purificação da enzima peroxidase. Através deste estudo, foi verificado que a resina Streamline™ SP apresentou maior capacidade de adsorção da enzima peroxidase. As melhores condições de pH a serem aplicadas na purificação da peroxidase corresponderam ao pH 5,0 em tampão fosfato de sódio 25 mM; ao pH 4,5 em tampão acetato de sódio 25 mM; e ao pH 5,0 em tampão citrato-fosfato de sódio 25 mM.

PALAVRAS-CHAVES: cromatografia, peroxidase, troca iônica.

ABSTRACT: The enzyme peroxidase catalyzes the oxidation of electrons from several oxidizable compounds using hydrogen peroxide as acceptor molecule. Among the methods used in purification of enzymes has to ion exchange chromatography in expanded bed, which offers advantages such as increased productivity and overall yield. The aim of this study was the adsorption at different ion exchange resins applicable in expanded bed column, and the definition of best pH conditions to be employed for further purification of the enzyme peroxidase. In this study, it was found that the resin Streamline™ SP showed a greater adsorption capacity for the enzyme peroxidase. The best pH conditions to be applied in the purification of peroxidase were to pH 5.0 in sodium phosphate buffer 25 mM; pH 4.5 in sodium acetate buffer 25 mM; and pH 5.0 in sodium citrate-phosphate buffer 25 mM.

KEYWORDS: chromatography, peroxidase, ion exchange.

1. INTRODUÇÃO

Dentre os subprodutos resultantes do beneficiamento de arroz, o farelo de arroz tem grande importância, representando de 8 a 11% do peso do grão (Maragno & Kuhn, 2013). Este contém diversos sistemas enzimáticos, com destaque para a peroxidase, o que o torna uma fonte potencial para obtenção desta enzima (Paucar-Menacho et al., 2007). Além disso, depois de utilizado o farelo de arroz para a extração da enzima peroxidase, este

pode ainda ser incorporado à formulação de rações animais e para extração de óleo, aumentando a versatilidade deste subproduto.

A enzima peroxidase (EC 1.11.1.X) tem por função catalisar a redução do peróxido de hidrogênio, outros peróxidos orgânicos e uma ampla variedade de compostos orgânicos e inorgânicos, a medida em que um doador de elétrons é oxidado (Maciel et al., 2007). As peroxidases podem ser extraídas de diversas fontes, como de mamíferos, plantas e micro-organismos (Cai et al., 2012).



A maior parte das aplicações da peroxidase se concentra no tratamento de compostos fenólicos contaminantes na presença de peróxido de hidrogênio. Devido à sua natureza oxidativa, há diversas áreas onde a peroxidase poderia substituir as técnicas atuais como oxidante químico (Hamid & Rehman, 2009). Atualmente, novas aplicações para as peroxidases foram descobertas, sendo recentemente utilizada para a degradação da micotoxina deoxinivalenol (DON) (Feltrin, 2013).

Em geral, a purificação de enzimas envolve inúmeras operações, tais como extração, separação, concentração e purificação. Dependendo do grau de pureza requerido, a purificação pode representar cerca de 50 a 90% do custo total de produção (Azevedo et al., 2009). Em processos de purificação, como cromatografia de troca iônica em leito expandido, que envolvem a separação por adsorção, é necessário que se determine as condições adequadas de operação (Moraes, 2009).

A cromatografia de troca iônica parte do mecanismo de separação baseado nas cargas das proteínas presentes no extrato, onde ocorre a competição dos íons de interesse e contaminantes pelos grupos carregados da fase estacionária. Esta técnica apresenta vantagens como a possível ampliação para a escala industrial, alta resolução, elevada capacidade de adsorção e versatilidade (Pessoa & Kilikian, 2005).

A cromatografia de troca iônica utilizando coluna de leito expandido é uma operação em que as proteínas de interesse são purificadas a partir de um extrato bruto ou clarificado (Amersham Pharmacia Biotech, 2008). Esta apresenta a vantagem de promover uma maior interação entre a molécula alvo, pois o leito se expande, aumentando o contato com a superfície adsorvente (Toledo et al., 2007). Além disso, obtém-se um rendimento global maior, e uma diminuição do tempo operacional e de custos com o processo (Xia, Lin & Yao, 2007).

Logo, este trabalho visou o estudo da adsorção em diferentes resinas de troca iônica aplicáveis em coluna de leito expandido, bem como a definição das melhores condições de pH a serem empregadas para a posterior purificação da enzima peroxidase.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

A matéria-prima utilizada para extração da enzima peroxidase foi o farelo de arroz integral (obtido através do polimento do arroz branco), cedido gentilmente pela indústria de armazenamento e distribuição Arrozeira Pelotas Ltda, situada na região de Pelotas.

Para o estudo da adsorção em diferentes resinas de troca iônica, foram utilizadas as resinas Streamline™ DEAE, Streamline™ Q XL, Streamline™ SP e Streamline™ SP XL, todos da marca GE Healthcare Life Science (Uppsala, Suécia).

2.2. Obtenção do extrato clarificado de peroxidase

A obtenção do extrato enzimático se deu através de um meio contendo 25 g de farelo de arroz do tipo integral (padronizado com a granulometria inferior a 0,425 mm) e 250 mL de tampão fosfato de sódio 40 mM pH 5,0. Este permaneceu sob agitação orbital (100 rpm) por 60 minutos. Logo após, o meio foi centrifugado a 3300xg a temperatura de 4°C, durante 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado em sistema a vácuo, tendo-se assim o extrato enzimático clarificado de peroxidase (Feltrin, 2013).

2.3. Estudo da adsorção em diferentes resinas de troca iônica

O ensaio foi realizado em um reator encamisado à 25°C, sob agitação mecânica, segundo a metodologia de Moraes (2009), com modificações. Nesse sistema, a resina de troca iônica e o extrato bruto de peroxidase foram adicionados na proporção de 1:10, respectivamente. No início de cada experimento, as resinas foram equilibradas



com uma solução tampão de fosfato de sódio 25 mM, no pH de estudo.

Já o pH do extrato bruto de peroxidase foi ajustado com solução 1 M de NaOH ou HCl aos valores a serem estudados (5,0; 6,5 e 7,5). Em intervalos de tempo pré-determinados, amostras foram recolhidas e determinadas suas respectivas atividades enzimáticas.

A atividade enzimática no equilíbrio (q^*) foi calculada conforme a Equação 1, a qual considera a atividade enzimática inicial (A_i); a atividade enzimática da peroxidase livre na fase líquida (A); o volume de extrato enzimático ($V_{extrato}$); o volume de resina (V_{resina}); e o volume total adicionado ao reator (V_{total}).

Já o coeficiente de partição foi calculado conforme mostra a Equação 2, a qual consiste no quociente entre a atividade enzimática no equilíbrio e a atividade enzimática da peroxidase livre na fase líquida.

$$q^* = \frac{(A_i \cdot V_{extrato}) - (A \cdot V_{total})}{V_{resina}} \quad (1)$$

$$f = \frac{q^*}{A} \quad (2)$$

Juntamente a este ensaio, foi realizado um ensaio controle, o qual consistia na adição do extrato enzimático (previamente ajustado no pH de estudo) ao sistema sem a resina de troca iônica, a fim de verificar se havia desnaturação da enzima nas condições do ensaio.

2.4. Efeito do pH no coeficiente de partição

Para avaliar o efeito do pH no coeficiente de partição, foi utilizada a resina Streamline™ SP. Os ensaios foram realizados em frascos erlenmeyers sob agitação orbital a 150 rpm e 25°C, segundo a metodologia de Moraes (2009), com modificações. A duração do ensaio correspondeu ao tempo necessário

para que se atingisse o equilíbrio, o qual correspondeu a 30 minutos.

Nesse sistema foi adicionada a resina de troca iônica e o extrato clarificado de peroxidase, numa proporção de 1:10, respectivamente. No início de cada experimento, a resina foi equilibrada com uma solução de tampão de fosfato de sódio 25 mM para pH de 7,5 a 5,0; de acetato de sódio 25 mM, para os pH 4,5 e 4,0; e de citrato-fosfato de sódio 25 mM para os pH 5,0 a 3,0. O pH do extrato de peroxidase foi ajustado com solução 1 M de NaOH ou HCl aos valores a serem estudados.

Ao final do tempo necessário a adsorção, amostras foram retiradas e determinadas suas respectivas atividades enzimáticas. Os parâmetros q^* e f foram determinados conforme as Equações 1 e 2, respectivamente.

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

2.4. Determinações analíticas

2.4.1. Atividade enzimática: A 1 mL de extrato enzimático diluído, foram adicionados 1,5 mL de tampão fosfato de sódio 5 mM pH 5,5, 2 mL de água destilada, 0,5 mL de solução de guaiacol 1% e 1 mL de peróxido de hidrogênio 0,08%. Em seguida, a mistura reacional foi levada a um banho termostático, onde permaneceu por 20 minutos a 25°C. Ao término da reação, a leitura da transmitância foi realizada em espectrofotômetro a 470 nm (Feltrin, 2013). Todas as análises foram realizadas em triplicata e com um ensaio de referência com a adição de 1 mL água destilada em substituição à amostra. Uma unidade da atividade da peroxidase (U) representa a quantidade de enzima que catalisa a oxidação de 1 μmol de guaiacol ($\epsilon = 26600 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) em 1 minuto. A atividade específica ($U\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína) foi calculada



pela razão da atividade da enzima ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) e o teor de proteína total ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

2.4.2. Determinação de proteínas: As proteínas foram determinadas segundo metodologia de Lowry et al. (1951), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Todas as análises foram realizadas em triplicata e com um ensaio de referência com a adição de água destilada em substituição à amostra.

2.4.3. Tratamento dos resultados: Os resultados foram tratados por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, bem como diferença de médias (Teste t), usando o software Statistica (Statsoft, EUA). A análise estatística foi realizada considerando um nível de 95 % de confiança ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Resina Streamline™ DEAE

O primeiro ensaio fez o uso da resina Streamline™ DEAE em pH 7,5, a qual é um trocador aniônico fraco. Esta não apresentou uma boa adsorção da enzima peroxidase, pois, ao longo do tempo, foi observada a ocorrência do processo de adsorção e dessorção da enzima. É possível que neste pH a enzima peroxidase esteja com uma carga líquida negativa baixa, de forma que esta se liga fracamente a resina de troca aniônica.

3.2. Resina Streamline™ Q XL

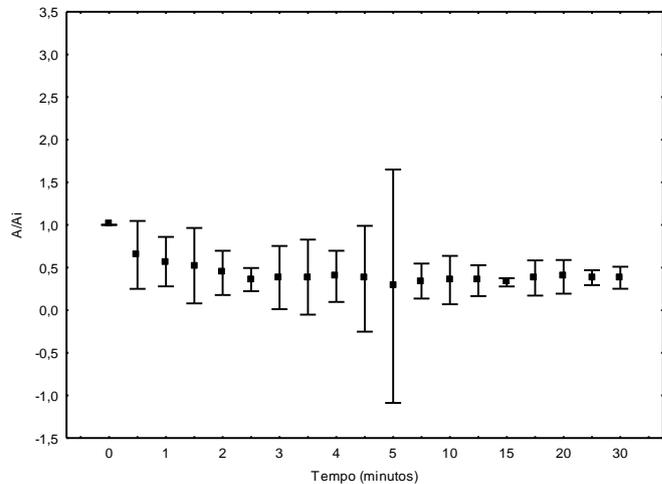
A resina Streamline™ Q XL foi testada em pH 6,5. Esta resina também não apresentou uma boa adsorção da enzima peroxidase. Aparentemente a resina aniônica não promoveu uma boa adsorção, e por esta razão foram testadas nos ensaios subsequentes duas resinas catiônicas.

3.3. Resina Streamline™ SP

Dentre as resinas catiônicas estudadas, a Streamline™ SP, trocador fortemente catiônico, foi testada em pH 5,0. O uso desta

resina proporcionou a adsorção da enzima peroxidase ao longo do tempo, uma vez que foi possível observar que a mesma diminuiu na fase líquida, conforme mostra a Figura 1.

Apesar de não haver relatos na literatura sobre o ponto isoelétrico da peroxidase extraída de farelo de arroz, é possível levantar a hipótese de que neste pH a enzima esteja com uma carga líquida positiva, de forma que esta se liga à resina de troca catiônica, justificando assim o comportamento por ela apresentado.

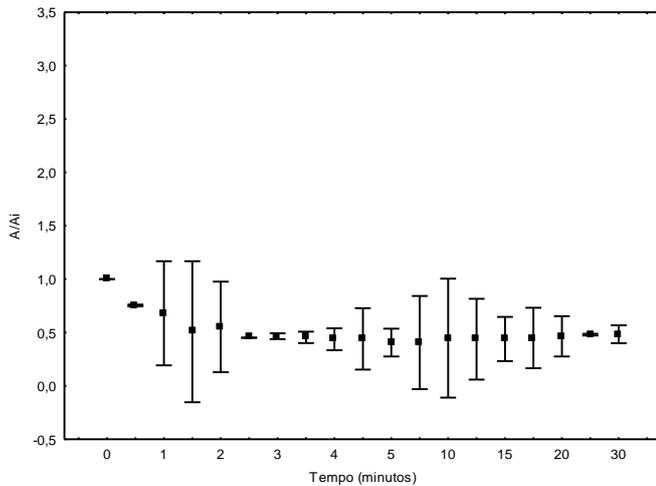


*Ensaio realizado em duplicata, com média e erro.

Figura 1. Curva cinética da adsorção da enzima peroxidase utilizando a Streamline™ SP em pH 5,0.

3.4. Resina Streamline™ SP XL

A resina Streamline™ SP XL se diferencia da Streamline™ SP pela sua maior capacidade ligante para algumas enzimas. A Figura 2 apresenta o comportamento da adsorção da enzima peroxidase na resina Streamline™ SP XL em pH 5,0, realizado em duplicata. Através desta figura, foi possível notar que a resina Streamline™ SP XL adsorveu a enzima ao longo do tempo.



*Ensaio realizado em duplicata, com média e erro.

Figura 2. Curva cinética da adsorção da enzima peroxidase utilizando a Streamline™ SP XL em pH 5,0.

3.5. Coeficiente de partição para as diferentes resinas catiônicas

A Tabela 1 apresenta a atividade enzimática no equilíbrio da peroxidase adsorvida na fase sólida (q^*) e coeficiente de partição (f) para as resinas Streamline™ SP e Streamline™ SP XL.

Tabela 1. Valores obtidos de q^* e f para as diferentes resinas.

Resina	pH	q^* (U.mL ⁻¹ de resina)	f
SP	5,0	3,19 ^a	18,67 ^a
SP XL	5,0	2,92 ^a	16,11 ^a

*Média de dois valores. Letras iguais na coluna indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste t ($p < 0,05$).

Devido à proximidade dos valores encontrados para as atividades enzimáticas no equilíbrio (q^*) e para os coeficientes de partição (f) das resinas Streamline™ SP e Streamline™ SP XL em pH 5,0, foi aplicado um teste de diferença de médias (Teste t), o qual demonstrou que não há diferença significativa entre os valores médios de q^* e f destas duas resinas. Logo, foi escolhida a resina

Streamline™ SP para os posteriores estudos de purificação.

3.6. Efeito do pH na adsorção da enzima peroxidase

Para verificar qual a melhor condição de pH a ser utilizada na posterior purificação da enzima peroxidase em resina Streamline™ SP, foi realizado um ensaio de adsorção numa faixa de pH de 7,5 a 3,0, com intervalo de 0,5 unidades, em diferentes soluções tampões.

A Tabela 2 apresenta os valores de atividade enzimática no equilíbrio da peroxidase adsorvida na fase sólida (q^*) e coeficiente de partição (f), quando utilizado o tampão fosfato de sódio 25 mM.

Os valores mínimos do coeficiente de partição foram obtidos nos valores de pH mais altos (7,5 e 7,0), enquanto que os maiores coeficientes de partição foram alcançados nos valores de pH mais baixos (5,5 e 5,0). O ensaio sem adição da resina mostrou que não houve desnaturação pelas condições de ensaio para os valores de pH 7,0, 6,0 e 5,0.

Foi observada também uma pequena desnaturação na atividade enzimática do extrato após o ajuste do pH para 5,0 e 5,5, em relação à atividade enzimática do extrato inicial (0,69 U/mL).

Os valores de q^* se mostraram estatisticamente iguais para as condições de pH 5,5 e 5,0. No entanto, houve diferença significativa para os coeficientes de partição nos valores de pH mencionados, sendo o f obtido para o pH 5,0 maior.

Assim, a condição de pH 5,0 foi escolhida como a melhor para tampão fosfato de sódio 25 mM.

A Tabela 3 apresenta os valores de atividade enzimática no equilíbrio da peroxidase adsorvida na fase sólida (q^*) e coeficiente de partição (f), quando utilizado o tampão acetato de sódio 25 mM.

Em ambas as condições de pH testadas para o tampão acetato de sódio, houve uma pequena desnaturação da atividade enzimática após o ajuste de pH, em relação à atividade enzimática do extrato inicial (0,69 U/mL).

Tabela 2. 1Valores de atividade enzimática no equilíbrio da peroxidase adsorvida na fase sólida (q^*) e coeficiente de partição (f) para tampão fosfato de sódio 25 mM.

Tampão	pH	Atividade inicial (U.mL ⁻¹)	q^* (U.mL ⁻¹ de resina)	f
Fosfato de sódio 25 mM	7,5	0,66	1,29 ^d ± 0,21	2,70 ^c ± 0,53
	7,0	0,66	1,70 ^c ± 0,09	3,84 ^c ± 0,28
	6,5	0,74	3,19 ^b ± 0,03	8,44 ^d ± 0,15
	6,0	0,65	3,18 ^b ± 0,11	10,54 ^c ± 0,71
	5,5	0,65	3,68 ^a ± 0,03	14,18 ^b ± 0,25
	5,0	0,60	3,68 ^a ± 0,07	17,29 ^a ± 0,85

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

Tabela 3. Valores de atividade enzimática no equilíbrio da peroxidase adsorvida na fase sólida (q^*) e coeficiente de partição (f) para tampão acetato de sódio 25 mM.

Tampão	pH	Atividade inicial (U.mL ⁻¹)	q^* (U.mL ⁻¹ de resina)	f
Acetato de sódio 25 mM	4,5	0,53	2,86 ^b ± 0,01	13,11 ^b ± 0,07
	4,0	0,54	3,29 ^a ± 0,08	17,67 ^a ± 1,08

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

O ensaio sem adição da resina mostrou que não houve desnaturação pelas condições de ensaio quando utilizado o tampão acetato de sódio 25 mM em pH 4,0, sendo o percentual de desnaturação para a condição de pH 4,5 de 3,5%.

Tanto o parâmetro q^* quanto o parâmetro f para o pH 4,0 foram maiores e estatisticamente diferentes quando comparado aos obtidos para o pH 4,5. No entanto, ensaios preliminares realizados em coluna de leito expandido mostraram que a condição de pH 4,0 se mostrou desfavorável para a purificação da enzima peroxidase, expondo a mesma a condições ácidas por longo período. Logo, a condição de pH 4,5 foi a escolhida para tampão acetato de sódio 25 mM.

A Tabela 4 apresenta os valores de atividade enzimática no equilíbrio da peroxidase adsorvida na fase sólida coeficiente

de partição, quando utilizado o tampão citrato-fosfato de sódio 25 mM.

O ensaio sem a adição da resina mostrou que houve desnaturação pelas condições de ensaio nos valores de pH 3,5 e 3,0, sendo esta de 6,3% e 23,3%, respectivamente. A desnaturação também foi observada quando a atividade enzimática após o ajuste de pH é comparada com a atividade enzimática do extrato inicial, sendo esta no pH 3,5 de 35% e no pH 3,0 de 59%. Embora tenha ocorrido adsorção nestes valores de pH, os mesmos se mostraram desfavoráveis em virtude das desnaturações provocadas.

Os valores de q^* e f se mostraram estatisticamente iguais para as condições de pH 5,0 e 4,0. Ainda, houve menor desnaturação quando a atividade enzimática do extrato antes do ajuste de pH para 5,0 é comparada com a atividade enzimática do extrato inicial (0,62 U/mL).



Tabela 4. Valores de atividade enzimática no equilíbrio da peroxidase adsorvida na fase sólida (q^*) e coeficiente de partição (f) para tampão citrato-fosfato de sódio.

Tampão	pH	Atividade inicial (U.mL ⁻¹)	q^* (U.mL ⁻¹ de resina)	f
Citrato-fosfato de sódio 25 mM	5,0	0,57	2,22 ^{bc} ± 0,10	6,92 ^{cd} ± 0,53
	4,5	0,57	1,76 ^c ± 0,21	4,88 ^d ± 0,85
	4,0	0,55	2,91 ^{ab} ± 0,52	12,53 ^c ± 4,62
	3,5	0,46	3,46 ^a ± 0,03	33,89 ^a ± 1,01
	3,0	0,29	2,08 ^c ± 0,02	28,00 ^b ± 0,88

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

Kalil (2000) construiu a curva cinética de adsorção para enzima inulinase, com atividade inicial de 19,95 U/mL utilizando a resina Streamline™ SP a pH 3,5 e 25°C. O valor de q^* encontrado foi de 995,8 U/mL de resina, o qual é superior aos obtidos neste trabalho. Entretanto, a enzima utilizada pela autora não é a mesma do presente trabalho, assim como a sua atividade inicial, a qual foi 40 vezes maior.

Uma vez que o uso do pH 5,0 pode proporcionar uma condição mais favorável para a posterior purificação da peroxidase, esta foi a escolhida como a melhor para tampão citrato-fosfato de sódio 25 mM.

4. CONCLUSÃO

Dentre as resinas estudadas, foi verificado que a resina Streamline™ SP apresentou maior capacidade de adsorção da enzima peroxidase. As melhores condições de pH a serem aplicadas na purificação da peroxidase corresponderam ao pH 5,0 em tampão fosfato de sódio 25 mM; ao pH 4,5 em tampão acetato de sódio 25 mM; e ao pH 5,0 em tampão citrato-fosfato de sódio 25 mM.

5. AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Educação Tutorial - MEC/SeSU pela concessão de bolsa de estudo.

6. REFERÊNCIAS

- AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH. *Expanded bed adsorption handbook: principles and methods*. [S.I.]: Uppsala, 2008.
- AZEVEDO, A.M.; ROSA, P.A.; FERREIRA, I.F.; AIRES-BARROS, M.R. Chromatography-free recovery of biopharmaceuticals through aqueous two-phase processing. *Trends Biotechnol.*, Lisbon, v. 27, n. 4, p. 240-247, 2009.
- CAI, F.; YANGA, C.O.; DUAN, P.; GAO, S.; XU, Y.; CHEN, F. Purification and characterization of a novel thermal stable peroxidase from *Jatropha curcas* leaves. *J Mol Catal B: Enzym*, v. 77, p.59–66, 2012.
- FELTRIN, A.C.P. *Aplicação da peroxidase para a degradação de deoxinivalenol*. 2013. 120 f. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2013.
- HAMID, M.; REHMAN, K.U. Potential applications of peroxidases. *Food Chem.*, v. 115, p. 1177-1186, 2009.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, n. 193, p. 265-275, 1951.
- MACIEL, H. P. F.; GOUVÊA, C. M. C. P.; TOYAMA, M.; SMOLKA, M.; MARANGONI, S.; PASTORE, G. M. Extraction, purification and biochemical characterization of a peroxidase from *Copaifera langsdorffii* leaves. *Quim. Nova*, Campinas, v. 30, n. 5, p.1067-1071, 2007.
- MARAGNO, V.P.; KUHN, R.C. Estabilidade do Farelo de Arroz Sob Diferentes Tratamentos:



Micro-ondas, Peletização e Desengorduramento. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde*, v. 15, p.47-53, 2013.

MORAES, C.C. *Purificação, modelagem e simulação da adsorção de bioprodutos por troca iônica em coluna de leito expandido*. 2009. 112 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.

PAUCAR-MENACHO, L.M.; SILVA, L.H.; SANT'ANA, A.S.; GONÇALVES, L.A.G. Refino de óleo de farelo de arroz (*Oryza sativa* L.) em condições brandas para preservação do γ -orizanol. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 27, p. 45-53, 2007.

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

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

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