



PURIFICAÇÃO DA ENZIMA PEROXIDASE DE FARELO DE ARROZ POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM LEITO EXPANDIDO

G.V. Gautério¹; S. S. Fernandes¹; 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 redução do peróxido de hidrogênio, como também de outros peróxidos orgânicos e compostos inorgânicos. Dentre os métodos empregados para a purificação de enzimas, destaca-se a cromatografia de troca iônica em coluna de leito expandido, a qual oferece vantagens como maior interação adsorvente-molécula alvo e rendimento global, e diminuição do tempo de processo. Este trabalho teve como objetivo purificar a enzima peroxidase de farelo de arroz em coluna de leito expandido. Para tal, foram realizados três ensaios em coluna utilizando a resina StreamlineTM SP, os quais se diferiam quanto ao tipo de sal e pH da solução tampão empregados no processo de purificação. O ensaio no qual se utilizou tampão acetato de sódio 25 mM pH 4,5 (equilíbrio e lavagem) e 4,7 (eluição) se mostrou a melhor condição para purificação, onde se obteve um fator de purificação e recuperação enzimática de 2,4 vezes e 41%, respectivamente.

PALAVRAS CHAVES: cromatografia, peroxidase, recuperação enzimática.

ABSTRACT: The enzyme peroxidase catalyses the reduction of hydrogen peroxide, as well as of other organic peroxides and inorganic compounds. Among the various preparative methods for the purification of enzymes, expanded bed adsorption chromatography stands out, because it offers several advantages, e.g. greater interaction between adsorbent and target molecule and overall yield, and shorter process times. The aim of this study was the purification of peroxidase, obtained from rice bran in expanded bed column. Therefore, three assays were carried out using StreamlineTM SP resin and various buffers differing in salt and pH values. The best purification results were obtained with a 25 mM sodium acetate buffer at pH 4,5 (equilibration and washing) and pH 4,7 (elution). Under these conditions, it was possible to achieve an enzyme purification factor of 2.4 and an enzyme recovery of 40.7%.

KEYWORDS: chromatography, peroxidase, enzyme recovery.

1. INTRODUÇÃO

A enzima peroxidase (EC 1.11.1.X) tem por função catalisar a redução do peróxido de hidrogênio, as custas de um doador de elétrons que é oxidado. Esta enzima pode ser extraída de diversas fontes, como de mamíferos, plantas e micro-organismos. As de origem vegetal são divididas em três classes de peroxidases, diferindo entre si através das

estruturas e propriedades catalíticas (Cai et al., 2012).

As peroxidases possuem um amplo campo de aplicação, entretanto a maioria destas concentra-se no tratamento de compostos fenólicos contaminantes na presença de peróxido de hidrogênio (Hamid & Rehman, 2009). Mais recentemente, novas aplicações para as peroxidases vêm sendo estudadas, tais como na degradação de



deoxinivalenol (DON) (Feltrin, 2013), síntese de vários produtos químicos aromáticos e remoção de peróxido de materiais, produtos alimentícios e de resíduos industriais (Hamid & Rehman, 2009).

O farelo de arroz é resultante da etapa de polimento do grão de arroz, representando de 8 a 11% do peso total do grão inteiro (Maragno & Kuhn, 2013). Contém diversos sistemas enzimáticos, com destaque para a peroxidase, o que o torna uma fonte potencial para a obtenção desta enzima (Paucar-Menacho et al., 2007). A obtenção de peroxidase através de um subproduto da agroindústria possibilita a redução nos custos de produção desta enzima, e viabiliza a aplicação desta em processos industriais (Feltrin, 2013).

A cromatografia de troca iônica baseia-se na competição entre íons de interesse e contaminantes pelos grupos carregados presentes em um trocador iônico, podendo este ser catiônico ou aniônico. A troca iônica pode ser utilizada em leito fixo e em leito expandido (Pessoa & Kilikian, 2005).

A cromatografia de troca iônica em leito expandido é uma operação em que as proteínas de interesse são purificadas a partir de um extrato bruto ou clarificado. A técnica proporciona uma maior interação entre o adsorvente e a molécula alvo devido à expansão do leito (Toledo et al., 2007). Além disso, promove um maior rendimento global e uma diminuição do tempo operacional (Xia, Lin & Yao, 2007).

Com base na grande aplicabilidade da enzima peroxidase, aliada à necessidade da purificação desta para certos fins industriais, o presente trabalho visou à purificação da peroxidase extraída do farelo de arroz utilizando a técnica de cromatografia de troca iônica em leito expandido.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Foi utilizado como matéria-prima para extração da enzima peroxidase o farelo de arroz integral (obtido através do polimento do

arroz branco), cedido gentilmente pela indústria de armazenamento e distribuição Arrozera Pelotas Ltda, situada na região de Pelotas.

Para o estudo do comportamento hidrodinâmico do leito e para a purificação da enzima peroxidase por cromatografia de troca iônica em coluna de leito expandido, foram utilizadas a resina de troca iônica Streamline™ SP e uma coluna Streamline™ 25 (2,5 cm de diâmetro x 100 cm de altura), ambos da marca GE Healthcare Life Science (Uppsala, Suécia).

2.2. Obtenção do extrato clarificado de peroxidase

O extrato enzimático foi obtido a partir 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 (100 rpm) orbital por 60 minutos. Após o término deste período, 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 do comportamento hidrodinâmico do leito

A hidrodinâmica do leito foi realizada conforme Moraes (2009). Inicialmente, a coluna foi preenchida com a resina até que esta fornecesse um leito fixo de 10 cm de altura. Foi alimentada à coluna uma solução tampão de fosfato de sódio 25 mM pH 5,0, com uma vazão crescente até que a superfície do leito passasse a ficar difusa e instável. Após essa fase, a alimentação foi realizada a vazões sucessivamente menores até zero, alterando-a em intervalos de 20 minutos para permitir a estabilização do leito. A altura do leito na qual correspondia a estabilização foi registrada e esta é expressa como uma função da velocidade linear. Este mesmo ensaio foi realizado com o extrato clarificado de peroxidase em substituição à solução tampão.



Como a adsorção em leito expandido baseia-se na fluidização, correlaciona-se a expansão do leito devido à vazão através de uma equação empírica proposta por Richardson-Zaki (1954), representada pela Equação 1. Inúmeros estudos em coluna de leito expandido utilizam esta relação para descrever as características de expansão do sistema (Tan et al, 2006; Severo Júnior et al, 2008).

$$\frac{U}{U_t} = \varepsilon^n \quad (1)$$

Onde U (cm.h^{-1}) representa a velocidade superficial do fluido; ε a porosidade do leito; U_t a velocidade terminal da partícula (cm.h^{-1}); e n o índice de expansão, ou coeficiente de Richardson-Zaki.

O coeficiente n de Richardson-Zaki é uma função do número de Reynolds terminal, e pode ser determinado teoricamente por equações que o correlacionem com o diâmetro da partícula e da coluna (Dasari et al., 1993). O mesmo ocorre para a velocidade terminal, a qual pode ser obtida por meio de correlações matemáticas (Massarani, 1997).

Em contrapartida, a determinação experimental da velocidade terminal e do coeficiente n à semelhança de Richardson-Zaki é possível quando a porosidade do leito é conhecida em cada velocidade de fluido. Para tal, parte-se de um leito sedimentado e com porosidade igual a 0,4 (Chang e Chase, 1996; Thomes et al, 1996; Kalil, 2000; Tan et al, 2006; Moraes, 2009). Através da linearização da Equação 1 obtém-se uma relação entre a velocidade superficial do fluido e a porosidade do leito, conforme mostra a Equação 2:

$$\ln U = \ln U_t + n \ln \varepsilon \quad (2)$$

A porosidade do leito expandido foi estimada através da Equação 3:

$$\varepsilon = 1 - \left[(1 - \varepsilon_0) \cdot \frac{H_0}{H} \right] \quad (3)$$

Onde ε_0 é a porosidade do leito sedimentado; H_0 a altura inicial do leito (10 cm); e H (cm) a altura final do leito.

2.4. Ensaios de purificação

Para a purificação da enzima peroxidase, foram utilizadas diferentes soluções tampões nas etapas de equilíbrio da resina, lavagem e eluição, as quais são apresentadas na Tabela 1. O emprego destas soluções e respectivos valores de pH tomam como base os bons resultados obtidos em estudos anteriores sobre a adsorção da enzima peroxidase em resina Streamline™ SP, os quais não serão abordados neste trabalho.

Os ensaios de purificação seguiram a metodologia de Moraes (2009) com modificações.

A coluna contendo 10 cm de leito de resina Streamline™ SP foi equilibrada com solução tampão de modo a alcançar o grau de expansão 2,5, até a obtenção de um leito estável. Após, foi feita a alimentação em fluxo ascendente de 220 mL do extrato clarificado de peroxidase diluído 1:2, ajustado ao mesmo pH do tampão de equilíbrio da resina, e em intervalos de 1 em 1 minutos foram coletadas frações.

Tabela 1. Soluções tampões empregadas nos ensaios de purificação.

Etapa	Ensaio		
	1	2	3
Equilíbrio	Tampão fosfato de sódio 25 mM pH 5,0	Tampão acetato de sódio 25 mM pH 4,5	Tampão citrato-fosfato de sódio 25 mM pH 5,0
Lavagem			
Eluição	Tampão acetato de sódio 25 mM pH 4,7		



Ao término da alimentação do extrato à coluna, foi realizada a etapa de lavagem utilizando o mesmo tampão de equilíbrio da resina, onde frações de 3 em 3 minutos foram recolhidas. A etapa de lavagem foi realizada até que a absorvância a 280 nm fosse menor que 0,2 e permanecesse constante. Logo após, a vazão foi interrompida e o leito de resina foi sedimentado até 10 cm.

Na etapa de eluição, o adaptador foi movido até a posição 10 cm e esta foi feita em modo fixo e em fluxo descendente. A eluição foi realizada em gradiente linear salino 0 a 1 M de NaCl em solução tampão, a uma velocidade de 100 cm.h⁻¹, e as frações foram coletadas de 2 em 2 minutos.

Todas as frações coletadas foram submetidas à verificação do volume, atividade enzimática, quantificação de proteína, leitura da absorvância a 280 nm e pH.

A eficiência da purificação foi avaliada através do fator de purificação (FP) e recuperação enzimática (REC), os quais são apresentados nas Equações 4 e 5, respectivamente:

$$FP = \frac{A_e EP}{A_e EI} \quad (4)$$

Onde $A_e EP$ representa a atividade específica (U.mg⁻¹) do extrato enzimático purificado (referente às frações coletadas na etapa de eluição) e $A_e EI$ a atividade específica do extrato enzimático inicial (alimentação).

$$REC (\%) = \frac{A_t EP}{A_t EI} \cdot 100 \quad (5)$$

Onde $A_t EP$ representa a atividade total (U) do extrato enzimático purificado (referente às frações coletadas na etapa de eluição) e $A_t EI$ a atividade total do extrato enzimático inicial (alimentação).

2.4. Determinações analíticas

2.4.1. Atividade enzimática: Para 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%. Logo após, 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 ($\epsilon = 26600 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) em 1 minuto. A atividade específica (U.mg⁻¹ de proteína) foi calculada pela razão da atividade da enzima (U.mL⁻¹) e o teor de proteína total (mg. 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.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Hidrodinâmica do leito

As características de expansão do leito para a resina Streamline™ SP com extrato clarificado de peroxidase e com tampão fosfato de sódio 25 mM pH 5,0 como meios de fluidização estão apresentadas na Figura 1.

A expansão do leito quando utilizado o extrato de peroxidase clarificado foi próxima à obtida com a solução tampão. Sendo assim, para uma mesma velocidade linear aplicada, a altura atingida pela resina, ao trabalhar-se com extrato clarificado, será semelhante quando aplicada uma solução tampão.

De modo geral, soluções proteicas quando aplicadas diretamente à coluna de leito expandido, apresentam maior expansão do leito em virtude de suas características.



Moraes (2009) verificou uma expansão do leito maior quando aplicou extrato bruto de *C-ficocianina*. O mesmo resultado foi observado por Kalil (2000) ao aplicar o caldo bruto de inulinase de *Kluyveromyces marxianus* à coluna de leito expandido.

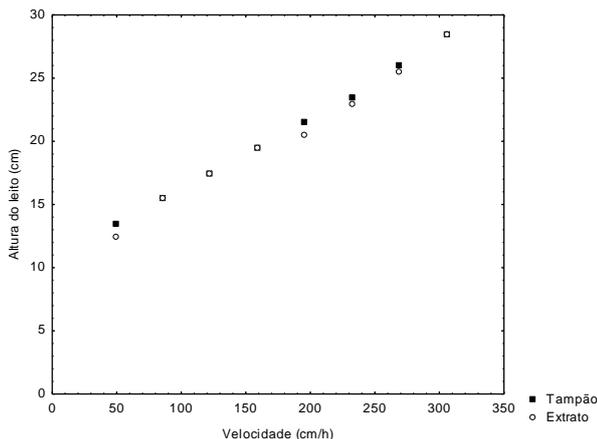


Figura 1. Altura de expansão do leito em função da velocidade superficial do fluido.

No presente trabalho, fez-se necessária a aplicação de uma etapa de clarificação para a retirada das partículas de farelo de arroz e gordura desta matéria prima. A remoção do material particulado pode modificar as características de expansão do leito quando utilizado o extrato enzimático, o que justifica o resultado obtido.

A Tabela 2 dispõe dos valores experimentais para a velocidade terminal e o parâmetro n de Richardson-Zaki, dados estes que permitem correlacionar a velocidade aplicada ao sistema com a porosidade do leito.

O alto coeficiente de regressão obtido (0,99) indica que a equação de Richardson-Zaki é um bom modelo pra predizer o comportamento hidrodinâmico de partículas adsorventes em sistemas de leito expandido.

A velocidade terminal e o expoente n de Richardson-Zaki, quando utilizado o extrato de peroxidase clarificado, foram menores do que os obtidos para a solução tampão. Kalil (2000) observou o decréscimo tanto da velocidade terminal (1056 cm/h) quanto do parâmetro n (5,3) para o caldo bruto de inulinase.

Resultados semelhantes também foram encontrados por Severo Júnior et al (2008) ao trabalhar com um fluidizante contendo malte de milho. Tan et al (2006) determinaram experimentalmente o parâmetro n de Richardson-Zaki, e obtiveram os valores de 5,23 e 5,17 para solução tampão e matéria proteica de *Escherichia coli*, respectivamente, sendo estes valores superiores aos obtidos no presente trabalho.

Tabela 2. Dados experimentais de velocidade terminal e expoente de Richardson-Zaki para tampão fosfato de sódio 25 mM pH 5,0 e extrato clarificado de peroxidase.

	Solução tampão	Extrato clarificado de peroxidase
Velocidade terminal (cm.h⁻¹)	1061,88	892,22
n	5,19	4,57

3.2. Ensaios de purificação

O primeiro ensaio (Ensaio 1) consistiu no uso do tampão fosfato de sódio 25 mM pH 5,0 para o equilíbrio da resina StreamlimeTM SP e para a etapa de lavagem, e na eluição foi utilizada um gradiente salino de 0 a 1 M de NaCl em tampão fosfato de sódio 25 mM pH 5,0. Neste ensaio, foi alimentado o extrato de peroxidase clarificado ajustado em pH 5,0 (atividade enzimática de 0,57 U.mL⁻¹). A Figura 2 apresenta o cromatograma resultante deste primeiro ensaio de purificação.

Foi possível notar que no final da etapa de alimentação e no início da etapa de lavagem ocorreu uma pequena perda da enzima de interesse, a qual coincidiu com o aumento do pH observado nas amostras coletadas.

Quando existe uma diminuição da quantidade de proteínas na etapa da lavagem até níveis constantes, significa que a mesma foi eficiente para remover as proteínas que não estão adsorvidas, o que ocorreu neste ensaio.



Na etapa de eluição, é possível observar que uma grande quantidade de proteína foi eluída junto com a enzima purificada, no momento em que a concentração salina se encontrava próxima a 0,4 M. A diminuição do pH de 5,13 para 3,81 durante a eluição pode ter ocasionado a desnaturação da peroxidase, fazendo com que uma menor quantidade de enzima purificada fosse recuperada nesta etapa.

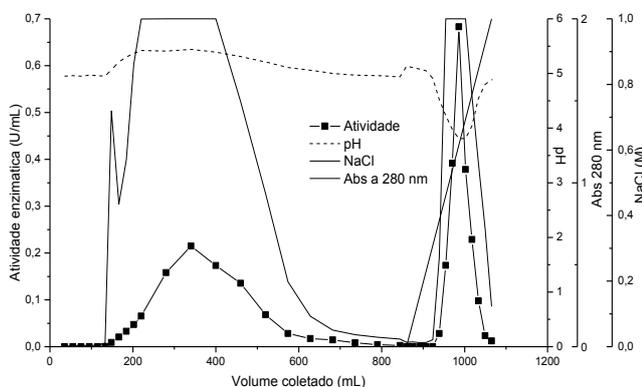


Figura 2. Cromatograma do processo de purificação de peroxidase, com eluição feita em gradiente linear salino 0-1 M em 220 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM em pH 5,0.

De acordo com Scopes (1988), o pH do microambiente de uma resina de troca iônica não é o mesmo da solução que está sendo aplicada devido ao efeito Donnan, que pode repelir ou atrair prótons da matriz adsorvente, onde o pH da matriz, para uma resina catiônica, é em torno de 1 unidade menor que da solução ao redor. Relacionando ao ensaio, o pH da resina Streamline SP seria em torno de 4,0, o que justifica a obtenção do pH 3,81 em uma das frações recolhidas na eluição, valor este que, como citado anteriormente, pode ter provocado a desnaturação enzimática.

Os valores obtidos neste ensaio para o fator de purificação e a recuperação enzimática foram de 1,1 vezes e 26%.

O segundo ensaio de purificação (Ensaio 2) consistiu no uso do tampão acetato de sódio 25 mM em pH 4,5 nas etapas de equilíbrio da resina e lavagem, e na eluição foi utilizado um gradiente salino de 0 a 1 M de NaCl em

tampão acetato de sódio 25 mM pH 4,7. Neste ensaio, foi alimentado o extrato clarificado de peroxidase ajustado em pH 4,5 (atividade enzimática de 0,45 U.mL⁻¹). A Figura 3 apresenta o cromatograma resultante deste segundo ensaio de purificação.

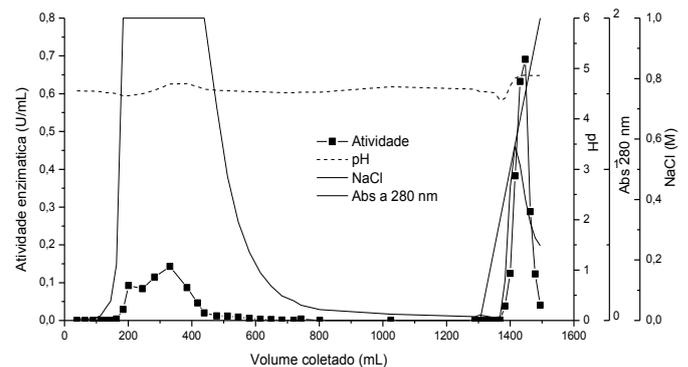


Figura 3. Cromatograma do processo de purificação de peroxidase, com eluição feita em gradiente linear salino 0-1M em 220 mL de tampão acetato de sódio 25 mM pH 4,7.

É possível verificar que na etapa de lavagem ocorreu uma pequena perda de enzima coincidindo com o aumento do pH da amostra coletada. Os valores da leitura a 280 nm mantiveram-se altos nas frações iniciais recolhidas na lavagem, entretanto, a quantidade de proteína na saída da coluna diminuiu ao longo do processo, o que indica que esta etapa foi eficiente para a remoção das proteínas não adsorvidas.

O pH permaneceu entre 4,5 e 4,9 na eluição, valores estes que não diferiram dos observados nas etapas de alimentação e lavagem, o que mostra que a utilização de um pH mais elevado na eluição em relação às demais etapas favoreceu a dessorção da peroxidase em condições mais amenas.

Ainda na etapa de eluição, é possível notar que a saída da enzima purificada iniciou no momento em que a concentração de NaCl correspondeu a 0,4 M, indicando a necessidade de uma baixa concentração salina para a eluição da enzima.

Os valores obtidos de fator de purificação e recuperação enzimática foram de 2,4 vezes e 41%. Os resultados indicam que as



condições deste ensaio favoreceram a recuperação da peroxidase, embora também tenha sido observada a perda da enzima ao longo da etapa de lavagem.

O terceiro ensaio de purificação (Ensaio 3) consistiu no equilíbrio da resina com tampão citrato-fosfato de sódio 25 mM pH 5,0; alimentação do extrato clarificado de peroxidase ajustado em pH 5,0 (atividade enzimática de $0,53 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$); lavagem com citrato-fosfato de sódio 25 mM pH 5,0; e eluição do tipo gradiente linear salino de 0 a 1 M de NaCl em tampão citrato-fosfato 25 mM pH 5,0. A Figura 4 apresenta o cromatograma obtido neste ensaio.

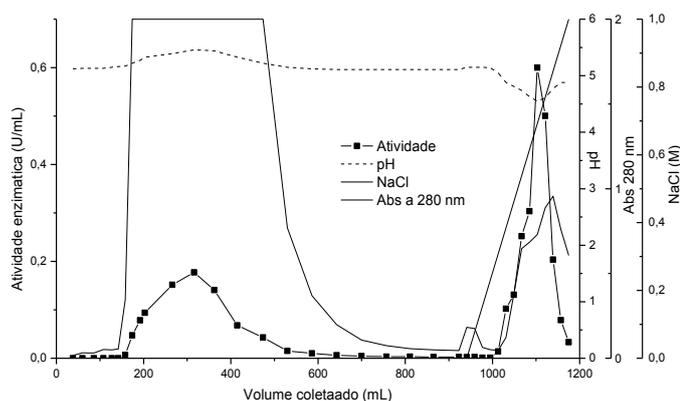


Figura 4. Cromatograma do processo de purificação de peroxidase, com eluição feita em gradiente linear salino 0-1M em 220 mL de tampão citrato-fosfato de sódio 25 mM pH 5,0.

Através da análise do cromatograma, foi possível observar que houve uma pequena perda da enzima de interesse no final da etapa de alimentação. Os valores da leitura a 280 nm foram menores nas amostras finais recolhidas na lavagem, indicando que a etapa foi eficiente para a remoção das proteínas fracamente adsorvidas na coluna.

Já na eluição, é interessante notar que a saída da enzima purificada iniciou no momento em a concentração de NaCl se encontrava próxima à 0,35 M. A diminuição do pH de 5,15 para 4,55 devido ao efeito Donnan também foi observada nesta etapa.

Após a eluição da enzima, o pH retornou a subir e atingiu o valor de 4,88.

Os valores obtidos neste ensaio para o fator de purificação e recuperação enzimática foram de 2,1 vezes e 37%. Estes resultados foram próximos aos obtidos no Ensaio 2 e superiores aos determinados no Ensaio 1.

Feltrin (2013) realizou a purificação da enzima peroxidase de farelo de arroz através de duas etapas, onde a primeira consistiu na precipitação da enzima com acetona, e a segunda na cromatografia de exclusão molecular com uma coluna de Sephadex G-100. A autora obteve um fator de purificação de 2,06 vezes e uma recuperação enzimática de 20%, valores estes inferiores aos obtidos nos Ensaios 2 e 3 apresentados neste trabalho.

Manu e Prasada-Rao (2009) após utilizar quatro etapas de purificação alcançaram um fator de purificação de 22 vezes e uma recuperação de 17% da enzima peroxidase obtida de farelo de trigo. No presente trabalho, foi possível obter uma recuperação enzimática superior ao encontrado pelos autores, utilizando um único processo de purificação.

4. CONCLUSÃO

No comportamento hidrodinâmico do leito, a expansão do leito para o extrato clarificado de peroxidase foi semelhante à obtida com a solução tampão. Já quanto à velocidade terminal e ao coeficiente de Richardson-Zaki, estes foram maiores para a solução tampão do que para o extrato clarificado de peroxidase.

A utilização da técnica de cromatografia de troca iônica em leito expandido pode ser empregada para a purificação da enzima peroxidase extraída de farelo de arroz. Quando se utilizou o tampão acetato de sódio 25 mM em pH 4,5 nas etapas de pré-equilíbrio na resina e lavagem, e um gradiente salino de 0 a 1 M de NaCl em tampão acetato de sódio 25 mM pH 4,7 na etapa de eluição, foi possível obter um fator de purificação e recuperação enzimática foram de 2,4 vezes e 41%, respectivamente.



4. AGRADECIMENTOS

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

5. REFERÊNCIAS

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

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.

CHANG, Y. K.; CHASE, H. A. Development of operating conditions for the protein purification using expanded bed techniques: the effect of the degree of bed expansion on adsorption performance. *Biotechnol Bioeng*, v. 49, p. 512-526, 1996.

DASARI, G.; PRINCE, I.; HEARN, M.T.W.; High performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins. *J Chromatogr*, v. 631, p. 115-124, 1993.

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.

KALIL, S.J. *Produção de inulinase por Kluyveromyces marxianus e purificação da enzima por cromatografia de troca iônica em coluna de leito expandido*. 2000. 154f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

LIENQUEO, M.E.; ASENJO, J.A. Use of expert systems for the synthesis of downstream protein processes. *Comput Chem Eng*, v. 24, p. 2339-2350, 2000.

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.

MANU, B.T. PRASADA-RAO, U.J.S. Calcium modulated activity enhancement and thermal stability study of a cationic peroxidase purified

from wheat bran. *Food Chem*, n. 114, p. 66-71, 2009.

MARAGNO, V.P.; KUHN, R.C. Estabilidade do farelo de arroz sob diferentes tratamentos: microondas, peletização e desengorduramento. *Cient Ciênc Biol Saúde*, v. 15, p.47-53, 2013.

MASSARANI, G. *Fluidodinâmica em Sistemas Particulados*. Rio de Janeiro: Editora UFRJ, 1997.

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 -orizanól. *Ciênc Tecnol Aliment*, v. 27, p. 45-53, 2007.

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

RICHARDSON, J.F. ZAKI, W.N. Sedimentation and fluidization: part I. *Trans Inst Chem Eng*, v. 32, n. 1, p. 35-53, 1954.

SCOPES, R.K. *Protein purification: principles and practice*. New York: Springer-Verlag, 1988.

SEVERO JUNIOR, J.B.; SANTANA, J.C.C.; SOUZA, R.R.; TAMBOURGI, E.B. Hidrodinâmica de uma coluna de adsorção em leito expandido para o uso em purificação de proteínas de malte de milho (*Zea mays*). *Exacta*, v. 6, p. 129-135, 2008.

TAN, Y.P.; LING, T.C.; TAN, W.S.; YUSOFF, K.; TEY, B.T. Purification of recombinant nucleocapsid protein of Newcastle disease virus from unclarified feedstock using expanded bed adsorption chromatography. *Protein Express Purif*, v. 46, p. 114-121, 2006.

THOMES, J.; BADER, A.; HALFAR, M.; KARAU, A.; KULA, M. Isolation of monoclonal antibodies from cell containing hybridoma broth using a protein A coated adsorbent in expanded beds. *J Chromatogr A*, v. 752, p. 111-122, 1996.

TOLEDO, A.L.; SEVERO JUNIOR, 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.