

Produção e cálculo do custo de um fármaco obtido do suco do abacaxi por microfiltração

Prof. Dr. Francisco Luiz Gumes Lopes (DAPIQ-CEFET, BA, Brasil) – lglopes@cefetba.br

Eng^a Dalva Sbruzzi (FEQ/UNICAMP, SP, Brasil) – dalvasbruzzi@gmail.com

Prof. Dr. José Carlos Curvelo Santana (UNINOVE, SP, Brasil) – jccurvelo@yahoo.com.br

• Av. Francisco Matarazzo, 612, Água Branca, CEP 05001-100, São Paulo-SP

Prof. Dr. Roberto Rodrigues de Souza (DEQ-UFS, SE, Brasil) – rrsouza@ufs.br

Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi (DESQ-FEQ-UNICAMP, SP, Brasil) - eliaitam@feq.unicamp.br

Resumo

Este trabalho objetivou produzir a bromelina a partir do abacaxi, bem como, determinar as condições ótimas desse processo utilizando membranas planas e determinar o seu custo de produção. Para tanto, variou-se a pressão transmembrana entre 0,05 e 0,15 bar e o pH entre 7,0 e 7,5 para avaliar seus efeitos sobre o índice de recuperação da bromelina. Também fez-se uma busca de preços de materiais e produtos utilizados. Os resultados mostraram que a condição ótima de obtenção das bromelinas foi na pressão de 0,05 bar em qualquer pH, onde o rendimento do processo superou os 85 %. O preço de custo mínimo de produção das bromelinas do abacaxi ficou entre 14 a 20 vezes menor que o preço comercializado e de 10 a 13 vezes que a mesma enzima quando é obtida por extração líquido-líquido, o que mostra a viabilidade econômica do processo de separação por membranas para a obtenção de bromelinas.

Palavras-chave: Ananas comosos; bromelina; membranas planas; custo de produção.

Abstract

The aim of this paper was based on the production of bromelain from pineapple, as well as determining the ideal conditions for this process, using the plain membrane system and also to calculate production costs. Therefore, the trans-membrane pressure was varied between 0.05 and 0.15 bar and the pH was varied between 7.0 and 7.5, in order to observe the effects this would have on the bromelain recovery yield. Also, a search of the material and product prices was effected. Results showed that the ideal conditions for obtaining bromelain enzyme recovery was at 0.05 bars within any of the pH ranges, where a yield of more than 85% was observed. Minimum costs for bromelain obtained by the plain membrane process were found to be from 14 to 20 times less than those of commercial bromelain and 10 to 13 times less than those of bromelain obtained through the liquid-liquid extraction process. This demonstrates the economical viability of the membrane separation process in bromelain production.

Keywords: Ananas comosos; bromelain; flat membrane; producing cost.

1. INTRODUÇÃO

A bromelina (EC 3.4.22.5), protease de massa molar igual a 31 kDa, é semelhante a ficina e a papaína, entretanto, ao contrário da papaína e da ficina a bromelina pode ser considerada uma glicoproteína que é formada de grupos de carboidratos protéicos com distinções simples, conforme descrito em Yasuda (1970).

Segundo Reguly (2000), as proteinases vegetais assim como a ficina, papaína e a bromelina e algumas proteinases microbianas, contém o grupo – SH, grupo sulfidril, no sítio ativo, que é essencial para a sua atividade proteolítica. As enzimas proteolíticas sozinhas respondem a 60 % das enzimas comercializadas, incluindo proteases microbianas. A bromelina é obtida a partir dos caules do Ananas comosos após a colheita do fruto, embora as folhas e o próprio fruto também a contenham, mas em menor quantidade.

A obtenção e o isolamento da bromelina a partir do abacaxi vêm sendo estudada desde 1894. Segundo Doko (1991), as aplicações da bromelina são numerosas, tendo uma maior utilização na indústria alimentícia, na medicina e na farmacologia.

O nível de purificação de uma enzima depende primariamente do uso a que se destina. A purificação desejada depende do número de etapas empregadas no processo e do uso a que se refere o produto final; uso acadêmico, uso industrial, uso terapêutico, dentre outros. Perde-se atividade em cada etapa de purificação, assim, para aumentar o rendimento, um número mínimo de etapas deve ser efetuado. Dessa forma, a escolha do método depende das propriedades da proteína e do grau de pureza desejado, conforme mostra o trabalho de Lima (2001).

Segundo Mallevialle *et al.* (1998), uma membrana pode ser definida como uma película delgada que separa duas fases e atua como uma barreira seletiva ao transporte de matéria. A membrana não se define como um material passivo e sim como um material funcional. Caracterizam-se por sua estrutura e seus rendimentos, sendo que a seletividade depende principalmente da natureza dos elementos contidos nas duas fases e da força motriz que é aplicada.

As membranas de microfiltração (MF) e ultrafiltração (UF) permitem separar solutos de elevadas massas molares, que são retidos no solvente em mistura com solutos de menor massa molar, que atravessam as membranas. São utilizadas em filtrações que visam concentrar e purificar concentrados enzimáticos. As membranas (MF) não servem para reter macromoléculas em solução, proteínas globulares muito grandes ou polissacarídeos, contudo, são apropriadas para recuperar células, uma vez que estas têm dimensões menores do que 0,3 μm . As membranas (UF) retêm colóides e partículas em suspensão, junto com proteínas e carboidratos de massa molar maior do que 300 D (Daltons). Estas membranas suportam pressões hidráulicas entre 7 e 700 kPa (MALLEAVIALLE *et al.*, 1998).

Este trabalho estudou a influência da pressão transmembranar e do pH sobre o índice de recuperação da bromelina, bem como a sua otimização na recuperação da enzima bromelina, proveniente do suco do Ananas comosos, utilizando processos de separação por membranas planas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Preparação do suco de abacaxi

O suco concentrado da polpa do abacaxi (*Ananas comosus*) foi preparado em condições de pressão e temperatura ambiente, utilizando-se uma massa de 650 g de polpa, que foi inicialmente filtrado em camada de algodão para retenção de sólidos dispersos. O pH do meio foi ajustado para as determinadas condições experimentais, usando tampão fosfato. O volume da solução foi ajustado para 1 litro.

2.2. Cálculo do rendimento do processo

A concentração de proteína total e a atividade enzimática foram determinadas no permeado e no concentrado. Foi realizada utilizando os métodos descritos por Bradford (1976) e por Murachi (1976) e Baldini (1993), respectivamente. O índice de recuperação das enzimas (% Recuperação) foi obtido segundo a equação 1, onde: $AC_{inicial}$ e AC_{final} são a atividade enzimática específica do concentrado inicial e final, respectivamente.

$$\% \text{ Recuperação} = \left(\frac{AC_{inicial} - AC_{final}}{AC_{inicial}} \right) \times 100 \quad (1)$$

2.3. Descrição do experimento

Os experimentos foram realizados em um módulo de membranas, constituídos por suportes planos, comportando uma folha de membrana em cada um dos lados e espaçadores colocados alternadamente entre os suportes, com o fluxo de alimentação circulando tangencialmente à superfície da membrana, conforme mostra a figura 1. As membranas utilizadas foram de polivinila com área de 0,0225 m² e tamanho dos poros igual a 0,1 µm.

Para uma melhor avaliação dos efeitos da pressão transmembrana e do pH sobre o rendimento da purificação da enzima fez-se um planejamento experimental variando-se a pressão transmebrana entre 0,05 e 0,15 bar e o pH entre 7,0 e 7,5 (BARROS NETO *et al.*, 2001, LOPES *et al.*, 2005 e 2007).

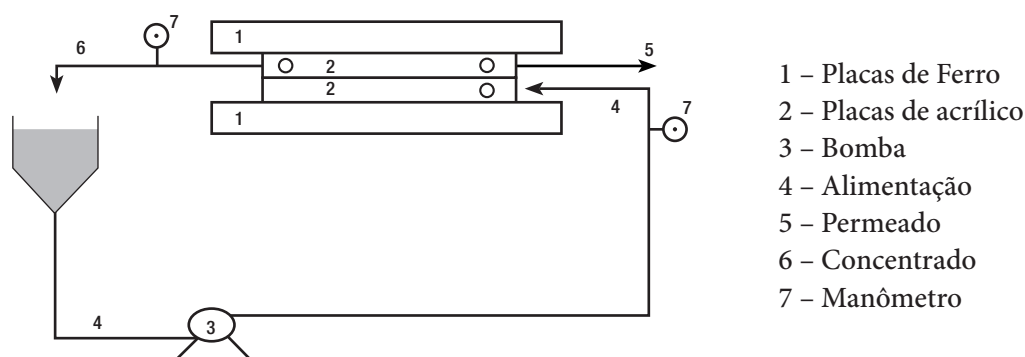


Figura 1 – Esquema da unidade experimental de microfiltração MMP-01.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Processo de obtenção

Os gráficos 1 e 2 apresentam o comportamento do fluxo de permeado dos ensaios realizados. Conforme mostra o gráfico 1, o tempo do fluxo do processo aumenta com o aumento da pressão transmembrana. Isto ocorre devido ao fato do pH neutro propiciar uma menor interação entre o caldo a ser concentrado e a superfície da membrana, o que contribui para a formação de uma camada superficial mais consistente que impede a passagem do fluxo de permeado, mesmo com o aumento da pressão (LOPES *et al.*, 2007; SEVERO JÚNIOR *et al.*, 2007).

No gráfico 2, quanto maior a pressão transmembrana menor o tempo e, conseqüentemente, maior o fluxo médio de permeado. Isto se deve ao fato do pH ligeiramente básico provocar uma repulsão do caldo a ser concentrado, o que diminui a deposição sobre a superfície da membrana, tendo, portanto, um menor efeito da polarização por concentração (LOPES *et al.*, 2005 e 2007; SEVERO JÚNIOR *et al.*, 2007).

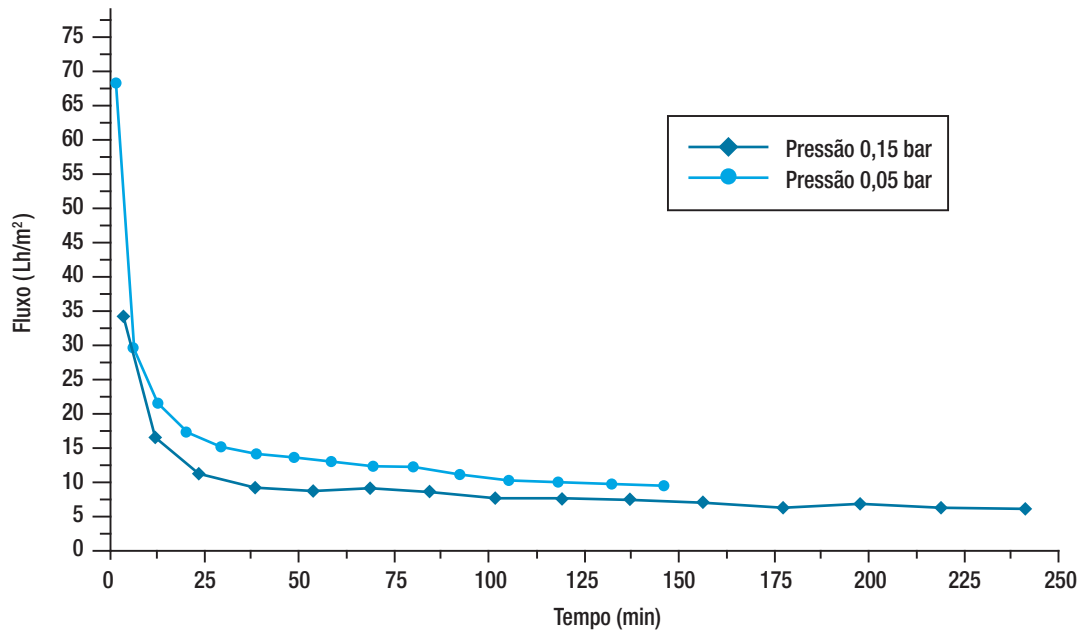


Gráfico 1 – Fluxo de permeado *versus* tempo de microfiltração a pH 7,0.

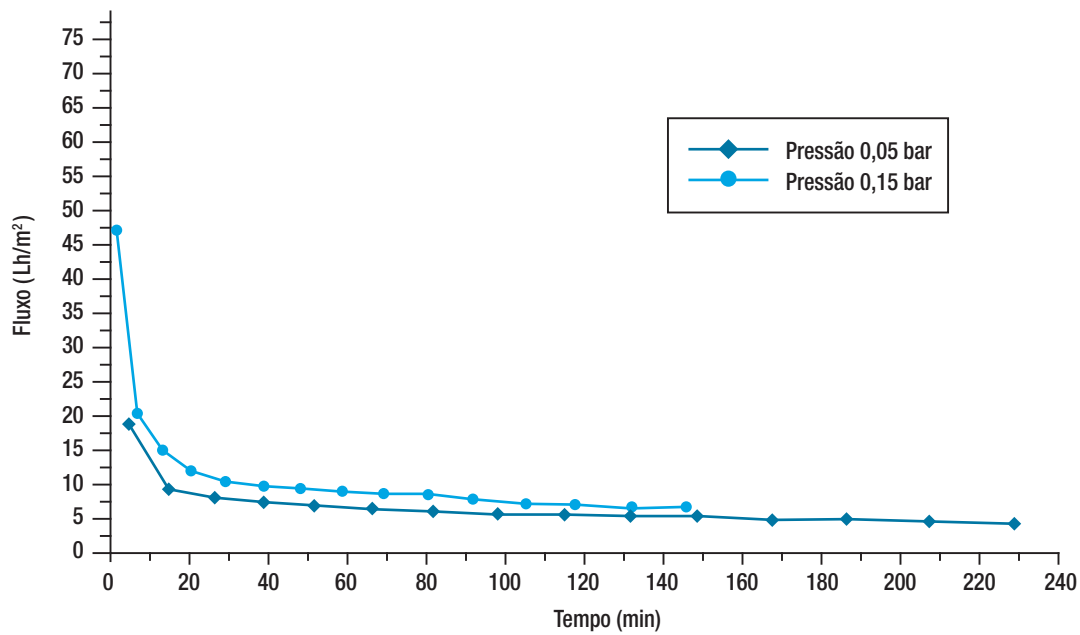


Gráfico 2 – Fluxo do permeado *versus* tempo de microfiltração a pH 7,5

No processo de microfiltração da bromelina deseja-se recuperar a enzima no permeado, então, a enzima é forçada a passar pelos poros da membrana. Assim, para avaliar a recuperação de macromoléculas o índice de recuperação (% Recuperação) é normalmente usado como indicador de eficiência do processo e seus resultados estão apresentados na tabela 1. Desta forma, ao se observar esta tabela, nota-se que a menor pressão resultou nos maiores valores de purificação da enzima (acima dos 85 %), independentemente do pH. Isto é decorrente do fato da elevação da pressão do sistema provocar rompimento ou modificação das estruturas das proteínas, seja através da passagem pelos poros da membrana ou através do rude contato com o fouling formado. Tem-se, então, uma redução da atividade específica, uma vez que esta está relacionada à concentração de proteínas totais.

Entretanto, pode-se considerar que a melhor condição de obtenção e ou purificação da bromelina do abacaxi seja no pH 7,5 e na pressão transmembrana de 0,05 bar, onde se alcançou um índice de recuperação superior aos 87 %. Este resultado foi superior ao obtido por Rabelo et al. (2004) que purificou esta mesma enzima usando o sistema de extração líquido-líquido usando co-polímeros.

Tabela 1 – Resultados dos experimentos de purificação em membranas planas.

Ensaio	pH	P (bar)	% Recuperação das enzimas
1	7,0	0,05	85,4857
2	7,5	0,05	87,2080
3	7,0	0,15	67,8739
4	7,5	0,15	29,7669

3.2. Levantamento do preço mínimo de custo

Não serão levadas em consideração as despesas com seguros, depreciação, materiais diversos e custos indiretos, para o cálculo do custo do produto farmacêutico (MARTINS, 2006).

A tabela 2 é um resumo dos valores cobrado pela Sabesp (2009) para o consumo de água e tratamento de esgoto na cidade de São Paulo, obtido em seu site, no mês de janeiro. O consumo de água durante um mês, para a produção das enzimas não é alto, e se encaixa perfeitamente no primeiro dos itens, mesmo quando consideramos a água gasta com limpeza.

Tabela 2 – Custo do fornecimento de água industrial.

m3	Água (R\$)	Esgoto (R\$)
0 a 10	26,21 / mês	20,96 / mês
11 a 20	3,10 / m3	2,46 / m3
21 a 50	5,18 / m3	4,14 / m3
> 50	6,54 / m3	5,22 / m3

Fonte: Sabesp (2009)

A seguir, na tabela 3 estão apresentados os valores da cotação dos reagentes utilizados, obtido pela empresa Vetec Química Fina Ltda (Duque de Caxias – RJ) no mês de janeiro de 2009 e a quantidade destes reagentes gastas por um litro de solução preparada. Na Tabela 5, estas massas foram calculadas para o gasto por hora e por dia.

Tabela 3 – Gasto na preparação de soluções utilizadas.

Reagente	Preço (R\$/kg)	Quantidade Usada (g/L)
Fosfato mono básico de potássio 0,2 M (FMP)	39,49	27,214
Fosfato di básico de sódio 0,2 M (FDS)	32,80	28,390
Hidróxido de Sódio	11,20	39,989

Fonte: Vetec (2009)

O levantamento de preços do abacaxi foi feito via o site da Ceagesp (2009) para o mês de janeiro e foi encontrado uma variação de preço de 2,06 - 3,14 R\$ por kg de abacaxi, reagentes e de água fornecida foi feito para o mês de janeiro de 2009 e o total final será comparado com o da bromelina comercializada pelo catálogo da Sigma (2006), mostrado na tabela 4.

A tabela 4 apresenta os preços de frascos de bromelinas comercializados pela Sigma (2006) para cada quantidade que o usuário desejar. O valor de 1 kg será utilizado como referência para as comparações deste trabalho, que ao ser convertido para a moeda nacional fica entre R\$ 2335,65 e R\$ 2582,07.

Tabela 4 – Preço de bromelina obtida do abacaxi. O produto contém 30% de proteína total (medida por Biureto), com atividade entre 3-7 U/mg medida a pH 4,6 e 25°C.

Frasco com	Valor (US\$)
10 g	28,70
25 g	47,10
100 g	317,40
500 g	648,50
1 kg	1075,40

*Uma unidade de atividade enzimática (U) corresponde a 1 μ mol de paranitrofenol por minuto a pH 4,6 e 25 °C.

**O preço do dólar oscilou entre 2,18 e 2,41 no mês de janeiro de 2009 (UolEconomia, 2009).

Fonte: Sigma (2006).

A tabela 5 apresenta os cálculos para a obtenção do custo do material protéico purificado, que no caso contém em parte as enzimas bromelinas, fazendo considerações de salários (R\$ 400,00) e os preços de valores dos produtos e de serviços obtidos até janeiro de 2009. O volume concentrado de enzimas com sendo 125 mL por hora por sistemas de membranas, ou seja, ao se usar 8 sistemas de membranas operando ao mesmo tempo, se obterá 1 L do produto farmacêutico por cada hora de processo.

O custo total foi elaborado com base na obtenção de um litro de enzimas concentradas, assim, todos os demais gastos com reagentes, matéria prima e serviços foram calculados em cima deste período. Desta forma, para a obtenção de um litro deste produto o custo de produção por hora está entre R\$ 127,70 e R\$ 162,99. Pode-se perceber que a obtenção das bromelinas do abacaxi por processos de separação por membranas tem um custo baixo.

Comparando-se o resultado apresentado na Tabela 4 (para 1 kg) com os valores da Tabela 5, nota-se que os preços da bromelina obtida por processos de separação por membrana são de 14 a 20 vezes menores que as mesmas enzimas vendidas pela Sigma (2006). Os preços de custos obtidos neste trabalho também foram de 10 a 13 vezes menores que o obtido por César (2006) que alcançou um valor de R\$ 1650,00 / kg de bromelina obtidas por extração líquido-líquido.

Tabela 5 – Levantamento de custo mínimo da produção de bromelinas do abacaxi. Uma hora = um litro do produto contendo 87 % de enzimas, enquanto que o produto da Sigma contém apenas 30 % de enzimas (ver tabela 4).

Item	Preço por Unidade	Quantidade (por h)	Custo (R\$ / h)
NaOH	11,20 R\$ / kg	0,020 kg	0,22
FMP	39,49 R\$ / kg	~0,005 kg	0,19
FDS	32,80 R\$ / kg	~0,005 kg	0,16
Água e esgoto	47,17 R\$ / mês	0,001 m3	0,27
Abacaxi Pérola	2,06 ~ 3,14 R\$ / kg	0,325 kg	0,67~1,02
Depreciação das Membranas*	29,17 R\$ / mês	8	R\$ 1,33
Materiais Diversos	~5,68 R\$ / h	1	5,68
Técnicos em Química**	5,68 ~ 6,82 R\$ / h	8	45,45 ~ 54,56
Eng. Químico**	18,18 ~ 22,73 R\$ / h	1	18,18 ~ 22,73
Técnicos Administrativos**	69,66 ~ 14,20 R\$ / h	3	28,98 ~ 42,61
Técnicos em Serviços Gerais**	3,41 ~ 3,54 R\$ / h	2	6,82 ~ 9,09
Energia***	0,27 R\$ / kW.h	1	0,27
ICMS (18 %)	18 % do valor	1	19,48 ~ 24,86
Total Geral	-	-	127,70 ~ 162,99

*Considerando-se que o preço da membrana seja de R\$ 700,00 e sua vida útil de 24 meses.

** Considerando-se um mês com 22 dias úteis, 8 horas de trabalho/dia, que o técnico em química receba entre 2,5 ~ 3 salários (1000 ~ 1200 R\$ / mês) 8 ~ 10 salários para o Engenheiro Químico (3200 ~ 4000 R\$/mês). Técnico administrativo recebendo entre 4,25-6,25 salários (1700 ~ 2500 R\$) e técnico em serviços gerais ganhando 1,5 a 2 salários (600 ~ 800 R\$).

***De acordo com a Eletropaulo (2009) a tarifa é de 0,27 R\$/kW (com os encargos financeiros)

3.3. Preço do produto

Utilizando-se os valores dos custos mínimos de produção, apresentados na tabela 5 (R\$ 127,70 e R\$ 162,99, menor e maior custos mínimos, respectivamente) e inserindo-se as porcentagens de margens de lucro sobre estes valores obtiveram-se as curvas mostradas no gráfico 3. Para uma margem de lucro de 50 % o preço pode estar entre R\$ 191,55 e R\$ 244,49, o preço de venda do produto está entre 9,5 e 13,5 vezes menor que o comercializado pelo catálogo da Sigma (2006) e mesmo quando a margem de lucro atinge 100 % (entre R\$ 255,40 e R\$ 325,99) o preço de venda é 7,2 a 10,1 vezes menor que o comercializado pela mesma empresa.

Já, quando se compara o preço de venda do fármaco obtido neste trabalho ao obtido por sistemas bifásicos aquosos, tem-se que para 50 % de margem de lucro, este preço está entre 6,7 e 8,6 vezes menor e que para 100 % de margem de lucro, este preço está entre 5,1 a 6,5 vezes menor (CÉSAR, 2006). Ou seja, os valores de margem de lucro aqui citados, deixam o produto obtido do abacaxi altamente competitivo comparado com os citados.

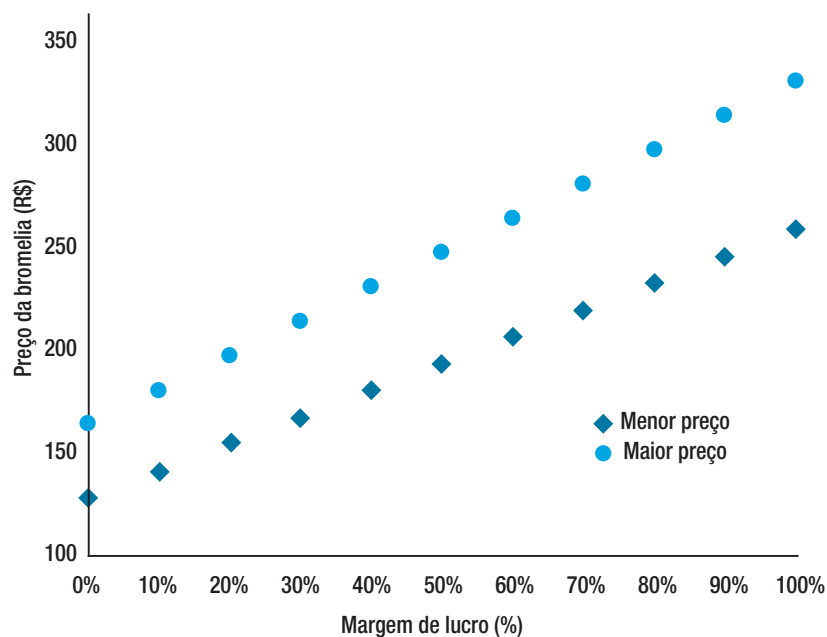


Gráfico 3 – Cálculo do preço do produto ao se inserir valores para a margem de lucro.

Utilizando-se os valores dos custos mínimos de produção, apresentados na tabela 5 e calculados para um mês de produção chega-se aos valores de custo mínimo mensal. Assim, obtém-se um custo mínimo mensal entre R\$ 22475,13 e R\$ 28686,84; para os valores dos custos mínimos por hora de R\$ 127,70 e R\$ 162,99, respectivamente, ambos para uma margem de lucro igual a zero e considerando-se 8 horas diária e 22 dias de trabalho por mês. Todos os valores possíveis de lucro (para preço mínimo e máximo) foram calculados e estão apresentados na tabela 6. Como já foi mostrado anteriormente, até mesmo para um lucro de 100 % o preço do produto é altamente competitivo, com relação ao apresentado na literatura e ao já comercializado. O que significa que o preço ainda se mantém viável, com obtendo-se um bom lucro e justificando a implementação de uma indústria de obtenção deste fármaco (a bromelina). Desta forma, pode-se confirmar a viabilidade econômica deste processo.

Tabela 6 – Cálculo do lucro mensal para as respectivas margens de lucro.

Margem de Lucro	Lucro mensal (R\$/mês)	
	Menor preço	Maior preço
0	0	0
10,00 %	2247,51	2868,68
20,00 %	4495,03	5737,37
30,00 %	6742,54	8606,05
40,00 %	8990,05	11474,74
50,00 %	11237,56	14343,42
60,00 %	13485,08	17212,10
70,00 %	15732,59	20080,79
80,00 %	17980,10	22949,47
90,00 %	20227,62	25818,15
100,0 %	22475,13	28686,84

4. CONCLUSÕES

No sistema de membrana plana temos o efeito da perda de carga muito mais elevado o que contribui para que a pressão não seja elevada evitando a desnaturação da enzima durante o processo de separação.

Sabendo-se que no caso de macromoléculas deve-se operar com condições operacionais que não descaracterizem a molécula de interesse, pode-se concluir que se utilizando um pH entre 7,0 e 7,5 e uma pressão transmembrana de 0,05 bar o sistema de membranas planas irá proporcionar um maior grau de separação.

O preço de custo mínimo de produção das bromelinas do abacaxi ficou entre e é de 14 a 20 vezes menor que o preço comercializado pela Sigma (2006) e de 10 a 13 vezes que a mesma enzima quando é obtida por extração líquido-líquido, o que mostra a viabilidade econômica do processo de separação por membranas para a obtenção de bromelinas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDINI, V. L. S. **Ocorrência da bromelina e cultivares de abacaxizeiro**. Colet. ITAL, v. 23, n.1, p. 44-55, Campinas, 1993.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S. & BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. Vol. 1, 1ª edição, Coleção Livros - Textos, Editora da UNICAMP, Campinas – SP, 2001, p 406.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein. Utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72. 248-254, 1976.

CEAGESP. **Preços no atacado**. Encontrado em: http://www.ceagesp.gov.br/cotacoes/?grupo=1&data=08%2F01%2F2009&consultar=Consultar&grupo_nome=Frutas, acessado de 8 até 13 de janeiro de 2009.

CESAR, A. C. W. Técnica reduz preço de extração da enzima do abacaxi. **Jornal da Ciência** (On line), junho de 2006.

DOKO, M. B.; BASSANI V.; CASADEBAIG J.; CAVAILLES L.; JACOB M. 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.

ELETROPAULO, **Tarifas para o fornecimento de energia elétrica**. Encontrado em: www.eletropaulo.com.br/portal/page.cfm?Conteudo_ID=703&desc=Tarifas%20de%20Energia, acessado em janeiro de 2009.

- LIMA, U. A.; AQUARONE, E. ; BORZANI, W. & SCHIMIDELL, W. **Biotecnologia industrial, processos fermentativos e enzimáticos**, São Paulo, v.3, Ed. Edgard Blucher, 2001.
- LOPES, F. L. G.; SEVERO JÚNIOR, J.B; SANTANA, J. C. C.; SOUZA, R. R.; TAMBOURGI, E. B. Avaliação de fenômenos redutores do fluxo de permeado em microfiltrações do suco do abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill). **Exacta**, São Paulo, v.5, n.2, 329-334, 2007.
- LOPES, F. L. G.; SEVERO JÚNIOR, J.B; SANTANA, J. C. C.; SOUZA, R. R.; TAMBOURGI, E. B. Utilização de membranas planas na concentração de enzimas bromelinas da polpa de abacaxi (*Ananas comosus*). **Brazilian Journal of Agroindustrial Product**, Campina Grande, v.7, n.1, 33-38, 2005.
- MALLEVIALLE, J.; ODENDAAL, P. E. & WIESNER, M. R. **Tratamiento del agua por procesos de membrana, Principios, procesos y aplicaciones**. McGRAW-HILL, 1998.
- MARTINS, E. **Contabilidade de custos**. Vol.1, 9^a edição, São Paulo: editora Atlas, 380p, 2006.
- MURACHI, T. Bromelain enzyme. In: LORAND, L: **Methods in Enzymology**, v. XLV, p. 475-585, New York, Academic Press, 1976.
- RABELO, A.P.B.; TAMBOURGI, E.B.; PESSOA JR., A. "Bromelain partitioning in two-phase aqueous systems containing PEO-PPO-PEO block copolymers." **Journal of Chromatography B**, 807(1), 61-68, 2004.
- REGULY, J. C. **Biotecnologia dos processos fermentativos, Produção de enzimas / Engenharia das Fermentações**. Pelotas, V. 3, Editora e Gráfica Universitária – UFPEL, 2000.
- SIGMA, **Reagentes bioquímicos para pesquisa em ciências da vida**. Catálogo 2004-2005, pp.321, 2006.
- SABESP. **Tarifa Sabesp**. COMUNICADO 01/08. 11p. Encontrado em: www2.sabesp.com.br/agvirtual2/asp/tarifas.asp, acessado em janeiro de 2009.
- UOL-ECONOMIA. **Cambio: Cotações de Dólar**. Encontrado em: <http://economia.uol.com.br/cotacoes/cambio.jhtm>, acessado em 15 de janeiro de 2009.
- SEVERO JÚNIOR, J.B; ALMEIDA, S. S.; NARAIM, N.; SOUZA, R. R.; SANTANA, J. C. C.; TAMBOURGI, E. B.; Wine Clarification from *Spondias mombin* L. Pulp by Hollow Fiber Membrane System. **Process Biochemistry**, vol. 42, pp.1516-1520, 2007.
- YASUDA, Y.; TAKAHASHI, N. & MURACHI, T. **The composition and structure of carbohydrate moiety of stem bromelain**. *Biochemistry*, 9(1), 25-32, 1970.
- VETEC **Química Fina Ltda**. Orçamento 5818. 1p, Janeiro de 2009.

