

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**AREA DE CONCENTRAÇÃO:
SISTEMAS DE PROCESSOS QUÍMICOS E INFORMÁTICA**

**ESTUDO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA BROMELINA PURA E
DO RESÍDUO DE ABACAXI EM DIFERENTES PH E TEMPERATURA CONSTANTE**

Autora: Mariele Nair de Campos Moura

Orientador: Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Engenharia Química como
parte dos requisitos exigidos para obtenção
do título de Mestre em Engenharia Química.

Campinas – São Paulo

Abril / 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

M865e Moura, Mariele Nair de Campos
Estudo da atividade enzimática da bromelina pura e do resíduo de abacaxi em diferentes ph e temperatura constante / Mariele Nair de Campos Moura. --Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Elias Basile Tambourgi.
Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Bromelina. 2. Análise enzimática. 3. Estabilidade. 4. Enzimas. I. Tambourgi, Elias Basile. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Enzymatic activity studies of pure and starch bromelain from pineapple at diferents ph and constant temperature

Palavras-chave em Inglês: Bromelain, Enzyme analysis, Stability, Enzymes

Área de concentração: Sistemas de Processos Químicos e Informática

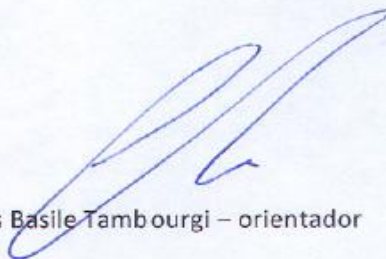
Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Priscila Gava Mazzola, Flávio Vasconcelos da Silva

Data da defesa: 19/02/2010

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

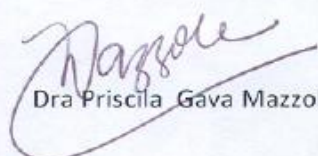
Dissertação de Mestrado, defendida por Mariele Nair de Campos Moura, em 19 de fevereiro de 2010, e aprovada pela banca examinadora:



Dr. Elias Basile Tambourgi – orientador

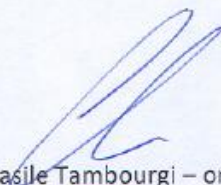


Dr Flavio Vasconcelos da Silva



Dra Priscila Gava Mazzola

Esta versão corresponde a final da Dissertação de Mestrado ,
defendida por Mariele Nair de Campos Moura em 19de fevereiro de 2010.



Prof Dr Elias Basile Tambourgi – orientador

Dedico:

Aos meus pais, Walter e Fatima com muito amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao Professor Elias Basile Tambourgi pelo incentivo, dedicação e amizade durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

A toda minha família, especialmente meus pais Walter e Fatima e minha irmã Juliana, pelo exemplo, ensinamento, amor, carinho, dedicação e incentivo dedicados a mim durante este trabalho.

A Kleber Maciel, pelo carinho e incentivo dedicados a mim durante este trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Processos de Separação, José Carlos, Juliana, Giovana, Dalva, Kleber, Edgar e Thayse pelo apoio, colaboração e amizade durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores, funcionários da Faculdade de Engenharia Química da Faculdade Estadual de Campinas – UNICAMP.

Aos amigos, que de uma forma ou outra contribuíram para a realização deste trabalho.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

RESUMO

Bromelina é o nome dado a um conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nos vegetais da família Bromeliaceae, na qual abacaxi é o mais conhecido. A bromelina é encontrada na casca, no talo e no fruto do abacaxi. A enzima não está presente nos primeiros estágios de desenvolvimento do fruto, seu nível aumenta rapidamente, ficando alto até a maturação do fruto. A bromelina tem diversas aplicações nas indústrias alimentícias e farmacêuticas. Com o desenvolvimento de novas técnicas de extração e purificação da bromelina, tornou-se necessário um estudo de estabilidade desta enzima. É importante saber em que condições a bromelina se mantém estável, ou seja, ativa e por qual período de tempo. Este trabalho apresenta um estudo da condição do pH em que a Bromelina P.A e a da casca e talo do abacaxi, mantém-se ativa, ou seja, não desnaturada e suas influências com o tempo. A atividade enzimática foi medida através da hidrólise da caseína. Foi observado que a bromelina P.A e a da casca e talo do abacaxi apresentam ótima atividade enzimática em pH neutro e mantêm-se estável por aproximadamente quinze dias.

Palavras Chaves: Bromelina, Análise enzimática, Estabilidade, Enzimas.

ABSTRACT

Bromelain is a set of proteolytic enzymes found in vegetables of the Bromeliaceae family, from which pineapple is known more. The bromelain is found in pineapple stem and fruit. The Enzyme are not presented in the early stages of fruit development, however, their levels increase quickly, remaining high until the maturation. Bromelain has several uses in food industry and pharmaceutical industry. The development of new extraction and purification processes of bromelain have been studied, however, its necessary a enzyme stabilization investigation. It is important to know the conditions and the time which bromelain remain stabilized, active. This work presents a study about pH condition which a bromelain aqueous solution and bromelain of a pineapple stem, remains with biological activity and its influences within time. The enzyme activity was tested across the casein hydrolysis. It was observed with a bromelain aqueous solution and bromelain of a pineapple stem showed optimum activity at neutral pH and 37 °C and kept stable for around fifteen days.

Key-words: Bromelain, Enzyme analysis, Stability, Enzymes.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
SUMÁRIO.....	ix
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – Introdução	1
1.2 – Objetivo	2
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 – Fruticultura Brasileira.....	3
2.2 – Produção, Produtos e Subprodutos do Processamento.....	4
2.3 – Caracterização e Composição Química do Abacaxi	5
2.4 – Enzimas.....	7
2.5 – Desnaturação	8
2.6 – Consumo de Enzimas	9
2.7 – Bromelina	10
2.8 – Consumo de Bromelina.....	11
CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1 – Materiais.....	13
3.1.1 – Reagentes	13
3.1.2 – Equipamentos	13
3.2 – Métodos.....	14
3.2.1 – Preparo das Amostras.....	14
3.2.2 – Procedimentos Experimentais.....	14
3.2.3 – Determinação da Atividade Enzimática	16
3.2.3.1 – Curva de Calibração.....	16
3.2.3.2 – Atividade Enzimática da Bromelina	16
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES	17
4.1 – Atividade Enzimática da Bromelina P.A em Função do Tempo para Diferentes pH	18
4.2 – Atividade Enzimática da Bromelina da Casca e Talo em Função do Tempo para Diferentes pH	20
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	22
5.1 – Conclusões.....	22

5.2 – Sugestão	23
CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	24
ANEXOS	31
ANEXO A. Descrição do método para a determinação da atividade proteolítica através da hidrólise da caseína:	31
ANEXO B. Método Espectrofotométrico.....	36

LISTA DE FIGURA

FIGURA 4.1 – Curva de calibração para determinar a atividade enzimática da bromelina.....	17
---	----

LISTA DE TABELA

Tabela 2.1 – Composição química média do abacaxi.....	6
Tabela 3.1 – Variáveis estudadas para a Bromelina P.A e Bromelina da casca e talo.....	15
Tabela 4.1 – Resultados da atividade enzimática obtidos para a Bromelina P.A. através da hidrólise da caseína a 37 °C.....	19
Tabela 4.2 – Resultados da atividade enzimática obtidos para a Bromelina da casca e talo através da hidrólise da caseína a 37 °C.....	21

LISTA DE ABREVIATURAS

a: Absortividade.

A: Absorbância.

b: Distância que a luz atravessa.

c: Concentração.

I: intensidade da luz incidente.

I₀: Intensidade da luz que conseguiu atravessar a amostra.

T: Transmitância.

TCA: Ácido tricloroacético.

U: Unidade de atividade enzimática ou específica ($\mu\text{mol}/\text{min}$)

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Introdução

Grande parte da história da bioquímica é a da pesquisa sobre enzimas. Louis Pasteur concluiu que a fermentação do açúcar em álcool pela levedura é catalisada por fermentos. Ele postulou que esses fermentos depois de nomeados enzimas eram inseparáveis da estrutura das células vivas dos levedos, uma hipótese que prevaleceu por muitos anos. Assim, as enzimas são moléculas orgânicas presentes nas células de organismos vivos, com a função específica de catalisar reações químicas. Possuem atividade catalítica específica, e ainda, apresentam elevada especificidade em relação aos reagentes cujas transformações químicas catalisam (HALPERN, 1997). O emprego de enzimas em diversos setores industriais vem crescendo há vários anos (FORGATY & KELLY, 1979; WISEMAN, 1987).

Bromelina é o nome genérico dado ao conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nos vegetais da família *Bromeliaceae*, na qual o abacaxi é o mais conhecido. Para obtenção da bromelina, podem ser utilizadas diferentes partes do abacaxi: folhas, talos, polpa da fruta, cascas e resíduos industriais do processamento do fruto. A Bromelina é uma cisteína proteinase e a planta *Ananas comosus* possui quatro cisteína proteinase distintas e duas no talo (ROWAN, BUTTLE & BARRETT, 1990). E atuam como ativadores da ação enzimática, agentes sulfetos, cianetos, sulfitos e cisteína.

A bromelina aplica-se em diversas áreas: indústrias de alimentos, indústrias farmacêuticas, indústrias de cosméticos (TECHNOBLE K. K. JAPAN; YAMADA, NAITO & SAWAKI, 1997) e na desodorização de gases (UYAMA SHIZUO; UDA & UYAMA, 1991).

Diante das possíveis aplicações e do crescimento da biotecnologia, ou seja, o surgimento de novas técnicas de extração e purificação, o estudo da estabilidade desta enzima no sistema torna-se necessário para que não ocorra a

desnaturação enzimática. Deve-se considerar que temperatura e pH, são fatores que exercem grande influência no processo de desnaturação. Assim, logo após a extração da enzima é possível utilizá-la em solução por um longo período de tempo e em condições apropriadas para mantê-la estável.

Neste trabalho, a atividade enzimática foi medida através da hidrólise da caseína utilizando solução de bromelina pura e da casca e talo do abacaxi.

1.2 – Objetivo

Geral:

- Estudo da atividade enzimática da bromelina pura e do resíduo de abacaxi em diferentes valores de pH a temperatura constante.

Específico:

- Determinar a melhor condição de armazenamento da bromelina;
- Determinar o período de tempo que a bromelina se mantém ativa.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Fruticultura Brasileira

Nosso país é um grande produtor de frutas tropicais e o abacaxizeiro destaca-se por possuir uma cultura muito exigente. Um fator que compromete a regularidade da produção possibilitando a geração de frutos que não se enquadram no padrão comercial é a não uniformidade do processo de florescimento (FERREIRA, 2007).

A época de colheita das frutas pode ocorrer durante o ano todo ou apenas por nove meses variando com as regiões de cultivo e com os ciclos de maturação (precoces ou tardias) no Estado de São Paulo. A colheita no clima tropical dura o ano todo e no clima temperado começa em setembro e se estende até junho. (GODOI, 2007).

A produção do fruto necessita de um clima favorável, clima quente ou mesotérmico, uma temperatura média entre 21 e 27 °C. O abacaxizeiro, planta sensível ao frio e resistente a seca, quando a temperatura está abaixo de 20 °C, a planta entra em estado de inatividade e quando ultrapassa 32 °C a planta é prejudicada pela transpiração excessiva (MEDINA, 1978).

A maturação da polpa e da casca do fruto inicia-se pela base estendendo para o ápice. Para a avaliação da maturação é necessário analisar o tamanho do fruto, a variedade do produto e as condições ecológicas (CÉSAR, 2000), ou seja, não julgar pela coloração da casca.

O Brasil produz em média de 30.000 a 40.000 frutos/ha/ano (CÉSAR, 2005). A colheita é feita manualmente, com o auxílio de um facão, conforme o tempo de amadurecimento de cada cultivar, seccionando a haste do fruto a 5-6 cm abaixo da fruta.

2.2 – Produção, Produtos e Subprodutos do Processamento

Na indústria de alimentos e para a obtenção de gomas e álcool etílico, utiliza-se o caule. O fruto fresco é utilizado para a fabricação de refrescos, sucos caseiros, doces e sorvetes. Segundo MEDINA et al. (1987) o suco do fruto é utilizado em alguns países como vermífugo e o fruto doce e fermentado utilizado na fabricação de vinhos. Na industrialização do fruto obtém-se geléia, polpa, xarope ou suco industrializado.

Estudos de purificação e extração de enzimas (RABELO, 2004) e aplicações terapêuticas da Bromelina (MYNOTT, 1999) tem gerado resultados satisfatórios com os resíduos agrícolas, especialmente a haste (*stem*). Grande parte da produção de abacaxi no Brasil é consumida ao natural, tornando a quantidade industrializada insignificante (BERTEVELLO 2001).

Segundo GIACOMELLI (1981), a coroa do fruto representa 25 % do peso médio que é de aproximadamente um quilo. O fruto é constituído por frutinhos, variando de 100 a 200, fundido entre si sobre o eixo central ou coração. O fruto é encontrado na forma cilíndrica ou ligeiramente cônico e sua polpa apresenta cor branca, amarela ou laranja-avermelhada.

As indústrias retiram o máximo do rendimento da fruta em relação ao produto principal (fruta em calda), secundário (suco simples e concentrado) e subprodutos (ração e suco da casca e de resíduos) (GODOI, 2007) para a integração da industrialização do fruto e evitam a produção de apenas um ou dois produtos.

O processamento do fruto inicia-se com a lavagem das frutas, corte da coroa e talo, seleção do fruto por tamanho (pequeno, médio e grande). Segundo GODOI (2007), entram na usina de processamento as frutas de tamanho médio que constituem 60 a 65 % do total de abacaxis. Em seguida é realizado o corte das extremidades, descascamento da fruta e raspagem da polpa da casca e extremidade do fruto.

Produtos tais como suco, pedaços cristalizados, vinho, licor, vinagre e etc. foram produzidos a partir do fruto natural e do processamento industrial. Ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico e bromelina foram produzidos como subprodutos.

O talo, fonte de amido, é aproveitado para extração de bromelina, enzima que auxilia a digestão (CÉSAR 2005). As folhas, para obtenção de fibras. A polpa, com alto valor energético, contém vitaminas A, B1 e C.

2.3 – Caracterização e Composição Química do Abacaxi

Segundo CÉSAR (2000), devido a industrialização do abacaxi tornou-se necessário padronizar a qualidade da fruta para a comercialização. Onde se observa:

- Cor: utilizada para avaliar a maturação, uma apreciação subjetiva, e qualidade do produto para o consumo e para a indústria, evitando a amadurecimento completo.
- Tamanho: na indústria é indispensável na regulagem das máquinas ginacas, onde comprimento e diâmetro são considerados.
- Sabor: como ocorre variação nas condições climáticas e mudanças de estação é importante manter a relação Brix/acidez total titulável.
- Forma: para evitar desperdício da polpa no processo de descascamento mecânico é viável a fruto no formato cilíndrico.

A composição química do abacaxi varia muito com a época em que é produzido. De modo geral, a produção ocorre no período de verão e gera frutas com maior teor de açúcares e menor acidez, como pode ser visto na tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Composição química média do abacaxi.

Componentes	Quantidade (por 100 gramas)
Glicídio	13,70
Proteínas	0,40 g
Lipídios	0,20 g
Cálcio	18,00 m
Ferro	0,50 mg
Fósforo	8,00 mg
Fibras	0,95 g
Niacina	0,82 mg
Ácido ascórbico	27,20 m
Tiamina	80,00 mcg
Riboflavina	128,00 mc
Retinol	5,00 mcg
Calorias	52,00 kcal

Fonte: FRANCO (1989).

O abacaxi destaca-se pelo valor energético, devido à sua alta composição de açúcares e valor nutritivo pela presença de sais minerais (cálcio, fósforo, magnésio, potássio, sódio, cobre e iodo) e de vitaminas (C, A, B1, B2 e Niacina). No entanto, apresenta teor protéico e de gordura inferiores a 0,5 % (FRANCO, 1989).

O suco de abacaxi, ligeiramente ácido, é um alimento energético para nosso organismo, 150 calorias. O teor de açúcares varia em geral em torno de 12 a 15 %, dos quais aproximadamente 66 % são de sacarose e 34 % de açúcares redutores. As cinzas, que apresentam 0,4-0,6 % do peso total, são ricas em bases, destacando-se o potássio, magnésio e cálcio, tornando o resíduo do processamento da bromelina de alto valor nutricional (CÉSAR, 2000).

2.4 – Enzimas

A pesquisa sobre enzimas é parte significativa na história da bioquímica. Contudo, no início do século XIX a catálise biológica foi reconhecida através da conversão do amido em açúcares simples pela saliva e por vários extratos vegetais e digestão da carne por secreções do estômago. No entanto, Louis Pasteur conclui que a fermentação do açúcar em álcool pela levedura é catalisada por fermentos, ou seja, enzimas eram inseparáveis da estrutura das células vivas dos levedos. Eduard Buchner em 1897 descobriu que extratos de levedos podiam fermentar o açúcar até o álcool, provando que as enzimas envolvidas na fermentação continuavam funcionando mesmo quando removidas da estrutura das células vivas. Desde então numerosos estudos vêm sendo realizados na tentativa do isolamento das numerosas enzimas e o estudo de suas propriedades catalíticas (CAMPESE, 2004).

As enzimas são moléculas orgânicas presentes nas células de organismos vivos, com a função específica de catalisar reações químicas. A enzima dá início ao aumento da velocidade de uma reação química por atuar como catalisador (SAID & PIETRO, 2002). Possuem atividade catalítica específica e elevada especificidade em relação aos reagentes cujas transformações químicas catalisam (HALPERN, 1997). Por ser economicamente viável, o emprego de enzimas em diversos setores industriais vem crescendo há vários anos (FORGATY & KELLY, 1979; WISEMAN, 1987).

Reações lentas em condições biológicas relevantes, não são catalisadas. Portanto, a maioria das moléculas biológicas são muito estáveis no ambiente aquoso de pH neutro e temperatura moderada encontrado no interior das células. Reações bioquímicas envolvem eventos químicos improváveis em condições do ambiente celular, como a formação transiente de intermediários eletricamente carregados e instáveis ou a colisão de duas ou mais moléculas com a orientação precisa e necessária para que ocorra a reação (LEHNINGER et al., 1995).

A característica distintiva de uma reação catalisada enzimaticamente é que ela ocorre no interior dos limites de uma cavidade, ou fenda, na estrutura molecular da enzima chamada sítio ativo. O substrato é a molécula que se liga ao sítio ativo e que sofre a ação da enzima. O complexo enzima-substrato é extremamente importante na reação enzimática, ou seja, ele é o ponto de partida para os tratamentos matemáticos que definem o comportamento cinético das reações catalisadas enzimaticamente e para as descrições teóricas dos mecanismos enzimáticos (SARTORELLO, 2004).

2.5 – Desnaturação

A desnaturação gera modificações fundamentais nas proteínas, destruindo, em particular, a sua atividade fisiológica (MORRISON, 1976). Na atividade das enzimas um agente crítico é a temperatura. A atividade aumenta com o aumento da temperatura, acelerando o processo de desnaturação devido ao calor (HALPERN, 1997). Segundo RICARDO & TEIXEIRA (1993) o pH exerce grande influência na manutenção da atividade enzimática, devido a alterações no estado de ionização dos componentes do sistema, em consequência da variação da concentração de H⁺.

Em grande parte da desnaturação de uma proteína ocorre a perda de sua atividade biológica característica. Quando uma solução aquosa de enzima, por exemplo, é aquecida até seu ponto de ebulição por uns minutos e depois resfriada, a enzima torna-se insolúvel e não apresenta mais atividade catalítica, ou seja, desnatura (HAQ et al., 2005; CORTEZ et al., 1999).

Em condições fisiológicas, moléculas de uma mesma proteína apresentam a mesma conformação denominada nativa. E quando submetida ao isolamento e purificação de uma proteína, onde ocorrem alterações físico-químicas no seu meio ambiente, sua estrutura espacial é afetada ocasionando a perda da função biológica. Assim, a proteína é dita desnaturada (CAMPESE, 2004).

A coagulação da clara de ovo pelo calor representa a desnaturação de uma proteína, a ovoalbumina. Depois que o calor coagulou a clara não sofre redissolução pelo resfriamento, nem forma outra vez a solução límpida como a original.

Segundo BORRACINI (2006), a agitação vigorosa da solução protéica até a formação abundante de espuma, presença de alguns íons ou sais caotrópicos em soluções com proteínas, exposição da proteína a determinados detergentes, força iônica, valores inadequados de pH, oxidação, solventes orgânicos, solutos e também a ação do calor são fatores que desnaturam a proteína.

A ocorrência da desnaturação durante tratamentos suaves e em condições amenas, não somente em drásticas, faz com que a proteína nativa seja frágil (YAO et. al., 2002).

2.6 – Consumo de Enzimas

O consumo de enzimas subdivide-se em aplicações industriais, enzimas para uso médico e enzimas para uso analítico e científico.

No contexto industrial, visa melhoria de processo e o uso de novas matérias primas aprimorando suas características físico-químicas (LIMA, 2001) em biotecnologia envolvendo genética, bioquímica, microbiologia e engenharia química.

As enzimas em diversas aplicações podem produzir um caminho intermediário que não possa ser obtido quimicamente para a melhorar a qualidade dos produtos (GODOI, 2007). Como exemplo, a aplicação de enzimas no processamento de couros (LIMA, 2001).

Em usos terapêuticos, as enzimas são de suma importância. São utilizadas em condições inflamatórias associadas a antibióticos ou analgésicos, como é o caso da tripsina e da quimotripsina. Segundo GODOI (2007), no debridamento de feridas, escaras e enxerto de pele, a papaína é essencial.

2.7 – Bromelina

Bromelina, nome genérico dado ao conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nos vegetais da família *Bromeliaceae*, sendo o abacaxi o vegetal mais conhecido. Para obtenção da bromelina, podem ser utilizadas diferentes partes do abacaxi: folhas, talos, polpa da fruta, cascas e resíduos industriais do processamento do fruto. As enzimas proteolíticas encontradas nos talos recebem o nome de bromelina do talo (EC 3.4.22.32), e as encontradas no fruto são chamadas de bromelina do fruto (EC 3.4.22.33). O teor de proteína total é igual para o fruto e o talo e a quantidade de enzimas proteolíticas no talo é 60 % menor. A enzima presente no fruto é mais ativa com relação à caseína do que a enzima presente no talo (SRIWATANAPONGSE, BALABAN & TEIXEIRA, 2000).

A Bromelina é uma cisteína proteinase e a planta *Ananas comosus* possui quatro cisteína proteinase distintas e duas no talo (ROWAN, BUTTLE & BARRETT, 1990). E atuam como ativadores da ação enzimática, agentes sulfetos, cianetos, sulfitos e cisteína.

A bromelina do talo é uma enzima sulfidrílica, essencial para a atividade proteolítica. A bromelina do fruto é uma proteína ácida, e seu ponto isoelétrico foi determinado por focalização isoelétrica como pH 4,6 e mudanças conformacionais irreversíveis ocorrem em valores de pH maiores que 10,3 (MURACHI, 1976).

Segundo CÉSAR et al. (1999), a enzima não está presente nos primeiros estágios de desenvolvimento do fruto, porém seu nível aumenta rapidamente, mantendo-se elevado até o amadurecimento, quando tem um pequeno decréscimo. No estado maduro o abacaxi mantém altas concentrações de proteases, mesmo com a diminuição da atividade proteolítica. No mamão e no figo, tanto a papaína quanto a ficina perdem as concentrações de proteases na maturação, sendo encontradas em altos níveis quando o fruto está verde.

A bromelina comercial é a obtida do talo (ROWAN et al., 1988) apesar da grande quantidade disponível de resíduos do abacaxi fruto proveniente das indústrias de conservas do abacaxi (CÉSAR, 2005).

Em outros trabalhos, estudou a extração da bromelina por micelas reversas (FISCHER, 2006; HEMAVATHI, HEBBAR & RAGHAVARAO, 2007 e UMESH, SUMANA & RAGHAVARAO, 2008) e também utilizando sistemas aquosos bifásicos por PEG/sal (fosfato de potássio) (CÉSAR, 2000).

Em estudos de análises de proteína total, açúcares redutores e atividade enzimática de amostras preparadas da polpa do fruto, da casca e do talo para a caracterização do meio inicial observou-se a possibilidade de recuperar grande parte da enzima originalmente presente superando 3 a 5 vezes a atividade específica inicial, durante a precipitação em um estágio com 80% (v/v) de etanol a 5 °C (CÉSAR, 1999).

2.8 – Consumo de Bromelina

A bromelina aplica-se em diversas áreas: indústrias de alimentos, indústrias farmacêuticas, indústrias de cosméticos (TECHNOBLE K. K. JAPAN; YAMADA, NAITO & SAWAKI, 1997) e na desodorização de gases (UYAMA SHIZUO; UDA & UYAMA, 1991).

Na indústria de cervejas, a bromelina pode ser utilizada como clarificante (BORRACINE, 2006). No amaciamento de carnes, pode-se utilizar a bromelina e a papaína (KIM & TAUB, 1991; FREIMAN DE OLIVEIRA, 2001).

Introduzida como composto terapêutico em 1957, a ação da bromelina inclui: inibição da agregação plaquetária, atividade fibrinolítica, ação antiinflamatória (HALE et al., 2005; SECOR et. al., 2009), ação antitumoral (MAURER et al., 1988; HARRACH et al., 1998), modulação de citocinas e imunidade, propriedade debridante de pele, aumento da absorção de outras drogas, propriedades mucolíticas; facilitador da

digestão (QUATTRUCCI et al.,1991), acelerador da cicatrização, melhora da circulação e sistema cardiovascular.

Bromelina é bem absorvida por via oral e a evidência disponível indica que sua atividade terapêutica aumenta com as doses mais altas. A bromelina parece ter tanto ação direta quanto indireta, envolvendo outros sistemas enzimáticos, ao exercer seus efeitos antiinflamatórios (MATTOS, 2005).

Em análise laboratorial, a bromelina é empregada como reagente na análise do sangue (SCOTT, JOHNSON & PHILLIPS, 1987; BOWELL, CULLY & YOUNG, 1988; OGASWARA & MAZDA, 1989; BLOEMBERGEN et al., 1987; TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES & WAKO PURE CHEM IND, SHUKUDA & NAKAJIMA, 1991) e no pré-tratamento de amostras de sangue a serem tipadas para o grupo ABO/Rh tornando fácil a retirada das proteínas de superfície, exposto os antígenos eritrocitários que respondem aos testes analíticos, após contato com a superfície das hemácias.

O *Ananas comosus* é um produto fitoterápico com ação mucolítica e fluidificante das secreções brônquicas e das vias aéreas superiores (CÉSAR, 2005). A bromelina também tem aplicação na esterilização de produtos farmacêuticos e alimentícios (RETROSCREEN LTD; SUTTON & OXFORD, 1990).

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Processos de Separação II, FEQ – UNICAMP.

3.1 – Materiais

3.1.1 – Reagentes

- Fosfato de Potássio Dibásico anidro P.A e Fosfato de Potássio Monobásico anidro P.A ambos fornecidos pela Synth (São Paulo).
- Hidróxido de Sódio fornecido pela Quimex.
- Ácido Clorídrico fornecido pela Merck.
- Caseína Pura fornecida pela Synth.
- Ácido Tricloroacético fornecido pela Sigma Chemical.
- Reagente de L-Tirosina P.A fornecido pela Synth.

3.1.2 – Equipamentos

- Balança Eletrônica Marte, modelo AL 200.
- pHmêtro Analyser pH 300.
- Banho Termostatizado FANEM, modelo 100.
- Espectrofotômetro UV-Vis Cary 1G.
- Liquidificador Walita Twist.

- Agitador Biomatic, modelo 1005.
- Micropipetas automáticas.

3.2 – Métodos

3.2.1 – Preparo das Amostras

Foram utilizadas como amostras solução 0,2 % de Bromelina P.A fornecida pela Sigma-Aldrich e Bromelina da casca e talo do abacaxi da espécie Pérola.

As amostras da casca e talo do abacaxi foram obtidas através de moagem da casca e talo em liquidificador por 5 minutos, a temperatura ambiente (24 ± 2) °C e filtrado em tela de Nylon para retirada de fibras e particulados presente no extrato.

3.2.2 – Procedimentos Experimentais

Para o estudo da avaliação do efeito do pH na estabilidade da atividade enzimática da bromelina, o pH das amostras provenientes da solução de Bromelina P.A e da casca e talo do abacaxi foram ajustados para 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0 com solução tampão de fosfato de potássio 0,1 M. Esta solução tampão foi preparada à partir dos sais fosfato de potássio dibásico e fosfato de potássio monobásico.

Após ajuste de pH, as amostras foram armazenadas primeiramente em geladeira a uma temperatura de $\pm 2^{\circ}$ C e a atividade enzimática medida periodicamente.

A Tabela 3.1 mostra as variáveis estudadas para a Bromelina P.A e a Bromelina da casca e talo neste trabalho.

Tabela 3.1 – Variáveis estudadas para a Bromelina P.A e Bromelina da casca e talo

Temperatura (°C)	Tempo (dias)	pH
2	0	6,0
2	3	6,0
2	7	6,0
2	15	6,0
2	0	6,5
2	3	6,5
2	7	6,5
2	15	6,5
2	0	7,0
2	3	7,0
2	7	7,0
2	15	7,0
2	0	7,5
2	3	7,5
2	7	7,5
2	15	7,5
2	0	8,0
2	3	8,0
2	7	8,0
2	15	8,0

3.2.3 – Determinação da Atividade Enzimática

3.2.3.1 – Curva de Calibração

Para determinação da atividade enzimática da bromelina através da hidrólise da caseína foi construída uma curva de calibração com solução L-Tirosina P.A em diferentes concentrações, abrangendo a faixa de resultados obtidos nas amostras. As concentrações das soluções foram de 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 mM de tirosina e as determinações foram feitas em triplicatas.

3.2.3.2 – Atividade Enzimática da Bromelina

Determinou-se a atividade proteolítica da bromelina através da hidrólise enzimática da caseína conforme modificações das metodologias propostas por KUNITZ (1947) e WALTER (1984).

Solução de caseína 2 % (m/v) e pH 7,5 a 37 °C durante 10 minutos, seguindo-se da precipitação do substrato não hidrolisado com solução de ácido tricloroacético (TCA). A quantidade de peptídeos solúveis em TCA (produtos hidrolíticos não precipitados) foi determinada em Espectrofotômetro UV-Vis Cary 1G a 280 nm. Utilizou-se Caseína Pura.

Uma unidade (U) de atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima capaz de variar em uma unidade a leitura de absorvância a 280 nm, durante 10 minutos a 37 °C.

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

A determinação da atividade enzimática para a Bromelina P.A e a Bromelina da casca e talo através da hidrólise da caseína foi realizada numa temperatura de 37 °C. RASHEEDI et al. (2003) e KHAN et al. (2003) caracterizaram a bromelina do talo e encontraram temperatura ótima de 37 °C. De modo geral, a literatura afirma que, temperaturas elevadas de uma ou duas dezenas de graus acima da temperatura do meio natural das enzimas, conduzem frequentemente, à perda de atividade (HALPERN, 1997).

A curva de calibração com L-Tirosina, para a determinação da atividade enzimática da bromelina como mostra a Figura 4.1 apresenta uma ótima linearidade, $R^2 = 0,9986$ e equação da reta $y = 0,0407x - 0,0064$. A concentração de tirosina utilizada foi de 0,25 a 3 mM.

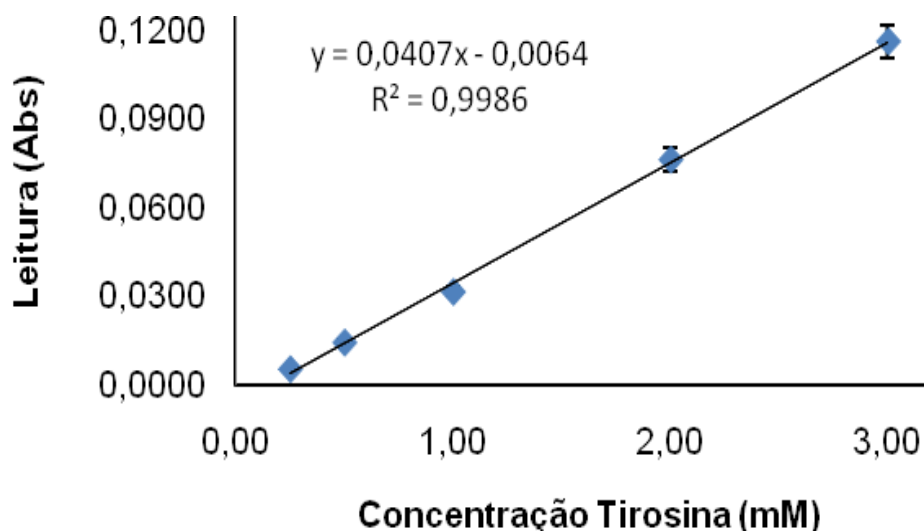


Figura 4.1 – Curva de calibração para determinar a atividade enzimática da bromelina.

4.1 – Atividade Enzimática da Bromelina P.A em Função do Tempo para Diferentes pH

O estudo do efeito do pH sobre a estabilidade da atividade enzimática da Bromelina P.A através da hidrólise da caseína a uma temperatura de 37 °C foi realizado variando o pH de 6,0 a 8,0 em tampão fosfato 0,1 M como pode ser verificado na Tabela 4.1. As soluções de bromelinas nos respectivos pH foram armazenadas em geladeira (Temperatura ± 2 °C).

Os resultados da Tabela 4.1 demonstram que a atividade enzimática da bromelina é afetada com o tempo.

É possível visualizar que a menor variação de atividade foi de 5,7 % para a solução de Bromelina P.A em pH 7,0 após três dias de armazenamento, sendo que, a maior variação foi de 18,85 % para a solução em pH 6,5. Durante o tempo total de armazenamento verifica-se que apenas as soluções de pH 6,0 e 8,0 apresentam uma tendência decrescente.

Observou-se que as atividades enzimáticas das amostras de Bromelina P.A próximas a pH neutro apresentam mais de 70 % da atividade inicial após os 15 dias de armazenamento.

Com os resultados obtidos, verifica-se que a perda de atividade enzimática entre o sétimo e o décimo quinto dia não foi tão significativa como nos primeiros 3 dias, tornando desnecessária a continuidade da determinação da atividade após o período de quinze dias.

Tabela 4.1 – Resultados da atividade enzimática obtidos para a Bromelina P.A. através da hidrólise da caseína a 37 °C.

Temperatura (°C)	Tempo (dias)	pH	Atividade (U/mL)	Varição de Atividade no Período (Δ) (%)
2	0	6,0	0,028	0,00
2	3	6,0	0,024	13,66
2	7	6,0	0,022	6,48
2	15	6,0	0,021	3,64
2	0	6,5	0,074	0,00
2	3	6,5	0,060	18,85
2	7	6,5	0,058	3,34
2	15	6,5	0,055	3,45
2	0	7,0	0,066	0,00
2	3	7,0	0,062	5,70
2	7	7,0	0,057	7,61
2	15	7,0	0,053	6,08
2	0	7,5	0,063	0,00
2	3	7,5	0,059	6,80
2	7	7,5	0,053	9,80
2	15	7,5	0,050	4,42
2	0	8,0	0,064	0,00
2	3	8,0	0,055	13,60
2	7	8,0	0,047	13,14
2	15	8,0	0,045	2,57

4.2 – Atividade Enzimática da Bromelina da Casca e Talo em Função do Tempo para Diferentes pH

O estudo do efeito do pH sobre a estabilidade da atividade enzimática da bromelina da casca e talo através da hidrólise da caseína a uma temperatura de 37 °C foi realizado variando o pH de 6,0 a 8,0 em tampão fosfato 0,1 M como pode ser verificado na tabela 4.2. As soluções de bromelinas nos respectivos pHs foram armazenadas em geladeira ($T \pm 2^{\circ} C$).

Analisando a Tabela 4.2, é possível visualizar que a menor variação de atividade foi de 5,0 % para a solução de Bromelina da casaca e talo em pH 7,5 após três dias de armazenamento, sendo que, a maior variação foi de 23,95 % para a solução em pH 6,0.

Comparando o comportamento das soluções de Bromelina P.A após sete dias de armazenamento com os das soluções de Bromelina da casca e talo em pH 6,5 e 7,5, verifica-se que também não apresentam uma variação significativa da atividade.

Observou-se que a atividades enzimática da amostra de Bromelina da casca e talo em pH 7,5, apresenta cerca de 75 % da atividade inicial após os 15 dias de armazenamento, considerando a proximidade do pH com o ponto isoelétrico da bromelina.

Tabela 4.2 – Resultados da atividade enzimática obtidos para a Bromelina da casca e talo através da hidrólise da caseína a 37 °C.

Temperatura (°C)	Tempo (dias)	pH	Atividade (U/mL)	Varição de Atividade no Período (Δ) (%)
2	0	6,0	0,043	0,00
2	3	6,0	0,033	23,95
2	7	6,0	0,023	23,13
2	15	6,0	0,019	9,23
2	0	6,5	0,028	0,00
2	3	6,5	0,024	13,33
2	7	6,5	0,020	14,44
2	15	6,5	0,016	14,45
2	0	7,0	0,030	0,00
2	3	7,0	0,026	14,03
2	7	7,0	0,016	32,17
2	15	7,0	0,015	3,37
2	0	7,5	0,020	0,00
2	3	7,5	0,019	5,00
2	7	7,5	0,017	10,00
2	15	7,5	0,015	10,00
2	0	8,0	0,018	0,00
2	3	8,0	0,015	16,67
2	7	8,0	0,013	11,11
2	15	8,0	0,010	16,66

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 – Conclusões

Neste trabalho, foi estudado o efeito do pH sobre a estabilidade da atividade enzimática da Bromelina P.A e da bromelina da casca e talo nos respectivos pHs, 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0 através da hidrólise da caseína 2 % (m/v) e pH 7,5 a 37 °C durante 10 minutos, seguindo-se da precipitação do substrato não hidrolisado com solução de ácido tricloroacético (TCA). A quantidade de peptídeos solúveis em TCA foi determinada em espectrofotômetro a 280 nm.

Para que não ocorra o uso indevido de faixas de pH e não ocorra uma redução na eficiência de métodos a serem utilizados, o estudo da estabilidade da enzima em diferentes pH é viável.

O resultado do estudo do efeito do pH sobre a estabilidade da atividade enzimática da bromelina da casca e talo mostra que a solução em pH 7,5 ainda apresenta 75 % da atividade inicial após quinze dias de armazenamento.

Os resultados mostram que as atividades enzimáticas das amostras de Bromelina P.A próximas ao pH neutro apresentam mais de 70 % da atividade inicial após os quinze dias de armazenamento.

Após a realização deste estudo, conclui-se que as soluções de bromelina em pHs próximos da neutralidade, podem ser preparadas e armazenadas a uma temperatura de ± 2 °C permitindo que a estabilidade se mantenha, ou seja, ativa, por aproximadamente quinze dias.

5.2 – Sugestão

Sugere-se para trabalhos futuros o estudo da atividade enzimática da bromelina pura e de resíduo de abacaxi em diferentes temperaturas.

CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

BERTEVELLO, L.C. **Estudo do Processo de Recuperação e Separação de Bromelina Utilizando Sistema de Duas Fases Aquosas em Micro-Coluna de Extração**. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2001. Tese (Doutorado).

BLOEMBERGEN, P. et al. Endotoxin-induced auto-immunity in mice. I. Time and dose dependence of production and serum levels of antibodies against bromelain-treated mouse erythrocytes and circulating immune complexes. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.** v. 84(3), p. 291-7, 1987.

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

BOWELL, P.J.; CULLY, B.J.; YOUNG, N.T. Bromelain solutions for use in automated anti-D quantitation: a potential hazard. **Med. Lab. Sci.** v. 45(2), p. 146-50, 1988. / Resumo 109:21256 no Chemical Abstracts/

CAMPESE, G.M. **Extração e recuperação da bromelina em sistemas de duas fases aquosas PEG4000 – policaju**. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2004. Tese (Doutorado).

CÉSAR, A.C.W.; SILVA, R.; LUCARINI, A.C. **Recuperação das enzimas proteolíticas presentes nas casca e talo do abacaxi**, p. 47-54, São Carlos, 1999.

CÉSAR, A.C.W. **Otimização dos parâmetros de extração líquido-líquido em duas fases aquosas na recuperação da Bromelina presente no abacaxi**. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2000. Dissertação Mestrado.

CÉSAR, A.C.W. **Análise de viabilidade econômica de um processo de extração e purificação da bromelina do abacaxi.** Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2005. Tese (Doutorado).

CORTEZ, E.V., PESSOA JR, A. Xylase and β -xylosidase separation by fractional precipitation. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 277-283, 1999.

FERREIRA, J.F. **Caracterização e purificação da enzima bromelina em sistema de duas fases aquosas PEG/fosfato.** Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007. Dissertação Mestrado.

FISCHER, G.A. **Estudo e modelagem do processo de extração da bromelina por micelas reversas em uma coluna de campânulas pulsantes.** Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2006, p. 45-49. Tese (Doutorado).

FORGATY, W.M. & KELLY, C.T. Topics in enzyme and fermentation. **Biotechnology**. v. 3, Chichester, G, Howood-J. Wiley & Sons, 1979.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos.** 8.ed. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 1989.

FREIMAN DE OLIVEIRA, L. Advantages of bromelain use in food processing and medicine. **Alimentos e Nutrição**, v. 12, p. 215-226, 2001./ Resumo 137:383915 no Chemical Abstracts/

GIACOMELLI, E.J.; PY, C. **Abacaxi no Brasil.** Campinas: Fundação Cargill, 1981.

GODOI, P.H. **Estudo da atividade enzimática da bromelina pura em solução em diferentes temperaturas e pH.** Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007. Dissertação Mestrado.

HALE, L.P. et al. Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations. **International Immunopharmacology**. v. 5(4), p. 783-793, 2005./ Resumo 142:423349 no Chemical Abstracts/

HALPERN, M.J. **Bioquímica**. 1.ed, Editora Lidel, Lisboa, Portugal, p. 233-303, 1997.

HAQ, S.K.; RASHEEDI, S.; SHARMA, P.; AHMAD, B.; KHAN, R.H. Influence of salts and alcohols on the conformation of partially folded intermediate of stem bromelain at low pH. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, p. 361-374, 2005.

HARRACH, T. et al. Isolation and characterization of two forms of an acidic bromelain stem proteinase. **J. Protein Chem.** v. 17(4), p. 351-361, 1998.

HEMAVATHI, A.B.; HEBBAR, H.U.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Reverse micellar extraction of bromelain from Ananas Comosus L. Merryl. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v. 82(11), p. 985-992, 2007. / Resumo na base de dados *Scopus* - Portal de Periódicos da CAPES/

KHAN, R.H.; RASHEEDI, S.; HAQ, S.K.; J. BIOSCI. **Effect of pH, Temperature and alcohols on the stability of glycosylated and deglycosylated stem bromelain enzymes**. v.28, p.709-714, 2003.

KIM, H.J.; TAUB, I.A.; Specific degradation of myosin in meat by bromelain. **Food Chem**, v. 40(3), p. 337-43, 1991.

KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor: II general properties. **J. Gen. Fision**. v. 30, p. 291-310, 1974.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L. & COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2.ed., São Paulo-SP, Sarvier Editora de Livros Médicos LTDA, 1995.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. v. 3, Editora Edgard Blucher Ltda, 2001.

MATTOS, P.E.O. **Validação Clínica da Suplementação de Bromelaína para Atletas**, Projeto de Pesquisa. Instituto de Farmacologia e Biologia Molecular, UNIFESP, São Paulo, 2005.

MAURER, H.R. et al; Bromelain induces the differentiation of leukemic cells in vitro: an explanation for its cytostatic effects? **Planta Med.**, v. 54(5), p. 377-81, 1988.

MEDINA, J.C.; BLEINTROTH, W.E.; HASHIZUME; T. **ABACAXI – da cultura ao processamento e comercialização**. ITAL, 1978.

MEDINA, JÚLIO CÉSAR ET AL. **Abacaxi: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1987.

MORRISON, R.T.; BOYD, R.N. **Química Orgânica**, 5.ed, 1976.

MURACHI, T. Bromelain enzymes. in: Lorand, I. **Methods in Enzymology**, v. xlv, New York, Academic Press, p. 475-85, 1976.

MYNOTT, T.L.; LADHAM, S.A.; SCARMATO, P. Bromelain from pineapple steams proteolytically blocks activation of extracellular regulated kinase – 2 in T cells. **The Journal of Immunology**, p. 2568-2575, 1999.

OGASWARA, K.; MAZDA, T. Differences in substrate specificities for cysteine proteinases used in blood group serology, and the use of bromelain in two-phase inhibitor technique. **Vox Sang.** v. 57(1), p. 72-6, 1989.

QUATTRUCCI, E. et al; Protein digestibility and organoleptic evaluation of enzymically treated milk. **Riv. Soc. Ital. Sci. Aliment.**, v. 20(4), p. 209-15, 1991. / Resumo 116:19955 no Chemical Abstracts/.

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, p. 61-68, 2004.

RASHEEDI, S.; HAQ, S.K.; KHAN, R.H. Guanidine hydrochloride denaturation of glycosylated and deglycosylated stem bromelain. **Biochemistry**. v. 68, 1097-1100, 2003.

RETROSCREEN LTD.; SUTTON, P.M.; OXFORD, J.S.; **Protease for the treatment of viral infections and sterilization of pharmaceutical and food products**. EP 358500, 1990./ Resumo 113:165408 no Chemical Abstracts/

RICARDO, C.P. & TEIXEIRA, A. **Enzimas**, 4.ed, Lisboa: Plátano Editora S.A., 1993.

ROWAN, A.D.; BUTTLE, D.J.; BARRETT, A.J. Ananain: a novel cysteine proteinase found in pineapple stem. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 267(1), p. 262-70, 1988.

ROWAN, A.D.; BUTTLE, D.J.; BARRETT, A.J. The cysteine proteinases of the pineapple plant. **Biochemical Journal**. v. 266, n. 3, p. 869-75, 1990.

SAID & PIETRO, R. **Enzimas de interesse industrial e biotecnológico**. Editora Eventos, 2002.

SARTORELLO, M.C. **Estudo do processo de extração de bromelina em sistemas descontínuo utilizando água, polietileno glicol e polissacarídeo da goma do cajueiro**. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2004. Dissertação Mestrado.

SCOTT, M.L.; JOHNSON, C.A.; PHILLIPS, P.K. The pH optima for papain and bromelain treatment of red cells. **Vox Sang.**, v. 52(3), p. 223-7, 1987.

SECOR Jr, E.R. et. al. Bromelain treatment reduces CD 25 expression on activated CD

44+ T cells in vitro. **International Immunopharmacology**, v. 9(3), p. 340-346, 2009. / Resumo na base de dados *Scopus* - Portal de Periódicos da CAPES/

SRIWATANAPONGSE, A.; BALABAN, M.; TEIXEIRA, A. Thermal inactivation kinetics of bromelain in pineapple juice. **Transactions of the ASAE**, v. 43(6), p. 1703-1708, 2000.

TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD, WAKO PURE CHEM IND LTD SHUKUDA, Y; NAKAJIMA, K. Stabilization of the bromelain solution with mercury for blood analysis. JP 08098688, Heisei, p.5, 1991. / Resumo 125:29130 no Chemical Abstracts/

TECHNOBLE K. K. JAPAN; YAMADA, K.; NAITO, K.; SAWAKI, S. Cosmetics containing rice starch hydrolyzates. JP 09169616, Heisei p. 19, 1997. / Resumo 127:166538 no Chemical Abstracts/

UMESH, H.H.; SUMANA, B.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Use of reverse micellar systems for the extraction and purification of bromelain from pineapple wastes. **Bioresource Technology**, v. 99(11), p. 4896-4902, 2008. / Resumo na base de dados *Scopus* - Portal de Periódicos da CAPES/

UYAMA SHIZUO; UDA H.; UYAMA, S. Deodorants for treating odorous gases from biological wastes. JP 03173564, **Heisei**, p. 3, 1991. / Resumo 115:189026 no Chemical Abstracts/

WALTER, H.E. Proteinases: methods with haemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Bergmeyer. H. U. Ed., **Methods of Enzymatic Analysis**, v. 5, Verlag Chemie, Weinheim, Germany, p. 270-277, 1984.

WISEMAN, A. **Handbook of enzyme biotechnology**. 2.ed, Edited by Ellis Horwood, New York, EUA, p. 460, 1987.

YAO C.Y.; TANG S.K.; ZHANG J.H.; YU Y.T. Kinetics of lipase deactivation in aot/isooctane reversed micelles. **Journal of Molecular Catalyses B-enzymatic**, 18(4 -6): 279-284, 2002.

ANEXOS

ANEXO A. Descrição do método para a determinação da atividade proteolítica através da hidrólise da caseína:

A determinação da atividade proteolítica pode ser realizada conforme modificações das metodologias propostas por KUNITZ (1947) e WALTER (1984), como está descrito a seguir:

A. Reagentes:

1. NaOH 1 M: Dissolver 4 g de NaOH em 100 mL de água (destilada ou deionizada).
2. Tampão fosfato 1 M, pH 7,5, dissolver:
 - a. 34 g de KH_2PO_4 em 250 mL de água.
 - b. 43,5 g de K_2HPO_4 ou 57 g $\text{K}_3\text{PO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ em 250 mL de água.
Juntar (b) com (a) e ajustar o pH para 7,5.
3. Ácido clorídrico, HCl 1 M: Adicionar 9,8 mL de HCl (a pelo menos 32 %) em 72 mL de água.
4. Preparo do substrato tamponado.
 - a. Solução tamponada de caseína (2 % m/v; fosfato 0,1 M, pH 7,5):
 - b. Suspender 2 g de caseína com cerca de 5 mL de água em um frasco volumétrico, adicionar NaOH (1), cerca de 30 mL de água e mexer bem com agitador magnético até que a caseína esteja completamente dissolvida. Adicionar 5 mL de tampão fosfato (2) para clarear a solução.

Ajustar o pH 7,5 com HCl (3) e diluir para 100 mL com água. Solução estável por 1 semana.

5. HCl 0,05 mol/L: Diluir 1 mL da solução (3) com 19 mL de água.
6. Solução estoque de tirosina (5 mmol/L): dissolver 45,3 mg de tirosina em 50 mL da solução de HCl (5) - S₀. Diluir para 3 (P₀), 2 (P₁), 1 (P₂), 0,5 (P₃) e 0,25 (P₄) mM com a solução (5). Homogeneizar a solução antes de diluir.
7. Ácido tricloroacético (TCA) 0,3 mol/L: Dissolver 4,9 g de TCA em 100 mL de água (ou diluir 30 mL de TCA 15% para 90 mL).
8. NaOH 0,5 mol/L: Diluir 50 mL da solução (1) em 50 mL de água.

B. Procedimento:

1. Pipetar em tubos de centrífuga separados: 2,5 mL de solução de substrato (4.1) nos tubos T e B₃, 2,5 mL de solução de HCl (5) em B₁ e B₂ e 2,5 mL de cada solução padrão de tirosina (6) (Padrões - P₀, P₁, P₂, P₃, P₄).
2. Deixar em banho por 3 a 5 minutos em temperatura de 37 °C.
3. Adicionar 0,2 mL da amostra (enzima) aos tubos T e B₁, e 0,2 mL de HCl 0,05 M (5) aos demais.
4. Misturar e deixar incubando por 10 minutos a 37 °C.

5. Ao fim do tempo adicionar 5 mL de TCA (7a).
6. Misturar e adicionar 0,2 mL de amostra ao branco.
7. Deixar em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Remover o precipitado por filtração ou centrifugação por 20 minutos a 2300 g.

C. Medida da Atividade:

Ler a variação de absorbância a 280 nm (no filtrado ou sobrenadante).

- a. Absorbância da amostra: A_T
- b. Absorbância do branco B_1 : A_{B1}
- c. Absorbância do branco B_3 : A_{B3}
- d. Através de $A_T - A_{B1} - A_{B3}$, encontra-se, na curva de calibração, a concentração de tirosina, C_{tir} , produzida pela ação da protease presente em 0,2 mL de amostra em 10 minutos a 37 °C.

O resultado final, em atividade enzimática, é dado por:

$$\text{Atividade} = 0,02 \cdot C_{tir} \text{ (}\mu\text{mol/min)}$$

D. Procedimento Esquemático:

TUBO T (Teste):

1. 2,5 mL de caseína 2 % (m/v); pH 7,5; tampão fosfato 0,1 M.
2. Repouso a 37 °C por 3 a 5 minutos.
3. 0,2 mL de amostra.
4. Misturar, deixar a 37 °C por 10 minutos.
5. 5 mL de TCA.
6. Repouso de 10 minutos a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a temperatura ambiente, 4000g durante 20 minutos.
8. Ler a absorvância do sobrenadante em 280 nm.

TUBO B₁ (Branco da amostra):

1. 2,5 mL de HCl 0,05 M.
2. Repouso a 37 °C por 3 a 5 minutos.
3. 0,2 mL de amostra.
4. Misturar, deixar a 37 °C por 10 minutos.
5. 5 mL de TCA.
6. Repouso de 10 minutos a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a temperatura ambiente, 4000g durante 20 minutos.
8. Ler a absorvância do sobrenadante em 280 nm.

TUBO B₂ (Branco do aparelho):

1. 2,5 mL de HCl 0,05 M.
2. Repouso a 37 °C por 3 a 5 minutos.
3. 0,2 mL de HCl 0,05 M (em substituição à amostra).
4. Misturar, deixar a 37 °C por 10 minutos.
5. 5 mL de TCA.
6. Repouso de 10 minutos a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a temperatura ambiente, 4000g durante 20 minutos.
8. Ler a absorvância do sobrenadante em 280 nm.

TUBO B₃ (Branco do substrato):

1. 2,5 mL de caseína 2 % (m/v); pH 7,5; tampão fosfato 0,1 M.
2. Repouso a 37 °C por 3 a 5 minutos.
3. 0,2 mL de HCl 0,05 M (em substituição à amostra).
4. Misturar, deixar a 37 °C por 10 minutos.
5. 5 mL de TCA.
6. Repouso de 10 minutos a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a temperatura ambiente, 4000g durante 20 minutos.
8. Ler a absorvância do sobrenadante em 280 nm.

ANEXO B. Método Espectrofotométrico

A espectrofotometria é um dos métodos utilizados para a determinação da atividade catalítica de uma enzima. A espectrofotometria e a colorimetria são métodos analíticos de medida da quantidade de luz absorvida por uma substância em solução. Todas as substâncias em solução absorvem luz num determinado comprimento de onda e transmitem-na a outros comprimentos de onda.

Conceito importante para a compreensão da espectrofotometria é a aplicação da Lei de Lambert-Beer, que afirma que a intensidade da luz emitida que atravessa um meio material é proporcional à potência do feixe e à quantidade de substância absorvente encontrada pela radiação no seu percurso através do meio considerado:

$$- \log I/I_0 = - \log T = A = abc$$

I = intensidade da luz incidente

I₀ = intensidade da luz que conseguiu atravessar a amostra

T = Transmitância

A = Absorbância

a = absortividade

b = distância que a luz atravessa

c = concentração

Analisando-se detalhadamente os princípios regentes da Lei de Lambert-Beer, verifica-se que a representação da absorbância de um sistema absorvente em função da concentração molar da espécie absorvente, deve ser uma linha reta. No entanto, as medidas de absorbância dos sistemas químicos reais conduzem a uma não completa

linearidade sobre toda a faixa das concentrações interessadas. Uma curvatura não significa necessariamente que não seja uma constante, independentemente da concentração. Mas quando isso ocorre tem-se um desvio real decorrente da limitação da própria lei, anteriormente enunciada.

Desvios reais ocorrem em consequência de interações que envolvem os centros absorventes e variação do índice de refração com a concentração. A Lei prevê que os centros absorventes atuam independentemente uns dos outros, isto é, manifestam interações recíprocas ou com íons e moléculas presentes.

Desvios químicos ocorrem quando a espécie absorvente sofre associação ou dissociação, ou então reage com o solvente. Assim, desvios químicos são desvios aparentes, pois a Lei de Lambert-Beer estabelece que a absorbância é diretamente proporcional à concentração real da espécie absorvente, mas não necessariamente, à concentração analítica de um componente.

Desvios instrumentais também são desvios aparentes relacionados com as limitações do instrumento utilizado como, caráter finito da faixa espectral isolada, radiações estranhas que alcançam o detector, não linearidade de resposta do detector e instabilidade da fonte.

A medida de absorbância deve ser feita a um comprimento de onda correspondente a um máximo de absorção sendo que é maior a variação de absorbância por unidade de concentração, alcançando-se a sensibilidade máxima. A relação entre a absorbância medida experimentalmente e a concentração da espécie é estabelecida com a construção de uma curva-padrão. Prepara-se para o elemento a determinar uma solução matriz (GODOI, 2005).