



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: SISTEMAS DE PROCESSOS QUÍMICOS E
INFORMÁTICA

ESTUDO DA ESTABILIDADE DA ENZIMA BROMELINA EXTRAÍDA DO
CURAUÁ (*Ananas erectifolius* L. B. SMITH)

Autora: Thayse Alves de Lima e Silva

Orientador: Elias Basile Tambourgi

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Campinas - São Paulo
Fevereiro/2012

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

Si38e Silva, Thayse Alves de Lima e
Estudo da estabilidade da enzima bromelina extraída do Curauá (*ananas erectifolius* L.Smith) / Thayse Alves de Lima e Silva. --Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Elias Basile Tambourgi.
Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

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

Título em Inglês: Study of the stability of the enzyme bromelain extracted from Curauá(*ananas erectifolius* L.Smith)

Palavras-chave em Inglês: Bromelain, Purification, Enzymes

Área de concentração: Sistemas de Processos químicos e Informática

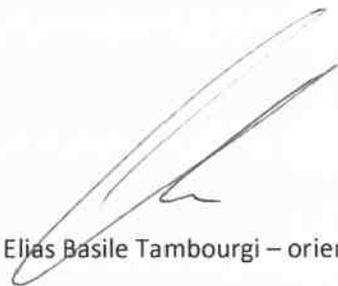
Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora: Juliana Moura de Luna, Luiz Carlos Bertevello, Ana Paula Brescancini Rabelo, Flavio Vasconcelos da Silva

Data da defesa: 28-02-2012

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Tese de Doutorado , defendida por Thaysse Alves de Lima e Silva, em 28 de fevereiro 2012
, e aprovada pela banca examinadora:



Dr. Elias Basile Tambourgi – orientador

Juliana Moura de Luna

Dra Juliana Moura de Luna



Dr. Luiz Carlos Bertevello

Ana Paula Brescancini Rabelo

Dra Ana Paula Brescancini Rabelo



Dr. Flavio Vasconcelos da Silva

Esta versão corresponde a final da Tese de Doutorado, defendida por
Thayse Alves de Lima e Silva em 28 de fevereiro de 2012..



Prof Dr Elias Basile Tambourgi – orientador

*Dedico este trabalho ao meu filho, Samuel,
grande presente de Deus em minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar saúde e disposição para correr atrás dos meus sonhos.

Ao Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi e sua família, orientador científico, pelo apoio, amizade, atenção e carinho em todos os momentos de realização deste trabalho.

A Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki, da Universidade Católica de Pernambuco, co-orientadora exemplar, amiga e incentivadora, a quem tanto devo pelos caminhos seguidos até hoje.

Ao professor Dr. Hiroshi Aoyama, do Laboratório de Enzimologia da Unicamp, pela paciência, ajuda e conhecimentos transmitidos.

Ao Sr. Juvenal Araújo e toda equipe da Pematec Triangel do Brasil pelo fornecimento das folhas do curauá para a pesquisa deste trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Processos de Separação, Dalva, Kleber, Petrus, Edgar, Diego e Giovana, pelo grande apoio e carinho, na realização deste trabalho.

Aos amigos Juliana Ferrari Ferreira, Iara e Igor Bresolin por toda ajuda, amizade, grande apoio e paciência nos momentos em que mais precisei durante a realização deste trabalho.

Aos meus pais, minha irmã e familiares pela ajuda, amor, apoio e confiança, o meu muito obrigada.

Ao meu marido, pessoa maravilhosa, mais que um amigo, que esteve sempre ao meu lado, me apoiando em tudo, nos momentos mais difíceis.

A Capes pelo suporte financeiro no decorrer deste curso.

RESUMO

O curauá (*Ananas erectifolius* L.B. Smith) é uma espécie vegetal de porte herbáceo, uma monocotiledônea pertencente à família Bromeliaceae, nativa da região norte do Brasil, especialmente da Amazônia, de onde pode ser extraída a bromelina. Esta enzima faz parte de um grupo de enzimas proteolíticas, usadas na indústria alimentícia e como medicamento, pois oferece amplo espectro de eficácias terapêuticas: antiédemas, anti-inflamatórias, antitrombóticas e atividades fibrinolíticas. O desenvolvimento de novos processos de extração e purificação de proteínas é muito importante, uma vez que essa é uma etapa limitante na produção de bioprodutos. Um dos grandes desafios na obtenção da bromelina é manter a sua estabilidade enzimática durante o processo de extração, purificação, secagem e estocagem. Por isso, estudos vêm sendo conduzidos para identificar os mecanismos que levam à desnaturação da proteína, e com isso, apontar formas de minimizar esta inativação. Desta forma, a determinação da atividade da enzima em plantas de curauá poderá proporcionar indicativos para posterior purificação e, assim, contribuir para a viabilização do uso desta espécie, uma vez que o principal produto de extração é a fibra, sendo que os demais componentes são, atualmente, descartados. Os resultados da caracterização mostraram que as condições ideais de trabalho são pH 6 e temperatura de 40 e 60° C para a variedade branca, e pH 6 e 7 e 40° C de temperatura para a variedade roxa. A massa molar é de 24 kDa, e melhor condição de estabilidade com maior atividade em pH 6 e temperatura entre 20 e 40°C, tanto para o curauá roxo, quanto para o branco, sendo este último, mais estável. Os parâmetros cinéticos demonstraram que o curauá roxo possui menor valor de K_m , com 158,73 $\mu\text{mol.L}^{-1}\text{min}$ e o branco, 185,18 $\mu\text{mol.L}^{-1}\text{min}$, apresentando ambas variedades, afinidade pelo substrato utilizado nos experimentos, azocaseína. O curauá branco demonstrou menor energia de ativação, demonstrando com isso, melhor atividade enzimática em comparação ao curauá roxo e a outras proteases. Esses resultados demonstraram valores significativos de atividade, energia de ativação e estabilidade, quando comparados com outras proteases, confirmando ser este um complexo enzimático com atividade hidrolítica.

Palavras -chave: Bromelina, Curauá, pH, Temperatura, Estabilidade.

ABSTRACT

The curaua (*Ananas erectifolius* LB Smith) is a herbaceous plant species, belonging to the family Bromeliaceae, native to northern Brazil, especially the Amazon, where it can be extracted bromelain. This enzyme is part of a group of proteolytic enzymes, used in the food industry and as a medicine, it offers wide range of therapeutic efficacies: anti-edemas, anti-inflammatory, antithrombotic and fibrinolytic activities. The development of new extraction and purification of proteins is very important, since this is a limiting step in the production of bioproducts. A major challenge is in getting the bromelain enzyme maintain its stability during the extraction, purification, drying and storage. Therefore, studies are being conducted to identify mechanisms that lead to protein denaturation, and thus pointing ways to minimize this inactivation. Thus, the determination of enzyme activity in plants may provide indicative curaua for further purification and thus contribute to the optimization of this specie, since the main product of the fiber is extracted, and the other components are currently discarded. The characterization results showed that the ideal working conditions are pH 6 and temperature at 40°C and 60°C for the white variety, and pH 6 and 7 and 40°C temperature for the purple variety. The molar mass is 24 kDa, and better stability condition with the highest activity at pH 6 and temperature between 20 and 40°C for both curauá purple, and for the white, the latter being more stable. The kinetic parameters showed that curauá purple has a lower K_m value with 158.73 $\mu\text{mol.L}^{-1}\text{min}$ and white 185.18 $\mu\text{mol.L}^{-1}\text{min}$. With both varieties, affinity for the substrate used in the experiments, azocasein was demonstrated. The white curaua showed lower activation energy, demonstrating that the better enzyme activity compared to purple curaua and other proteases. These results showed significant amounts of activity, activation energy and stability when compared with other proteolytic enzymes, confirming that this is a complex enzymatic with hydrolytic activity.

Key words:: Bromelain, Curaua, pH, Temperature, Stability.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – REVISAO BIBIOGRAFICA	1
1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVOS	5
2.1. Objetivo geral	5
2.2. Objetivos específicos	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1. CURAUÁ	6
3.2. PROTEÍNAS	11
3.2.1 Desnaturação	13
3.3. ENZIMAS	14
3.3.1. Propriedades gerais	16
3.3.2. Estabilidade estrutural	18
3.3.3. Efeito do pH na atividade enzimática	18
3.3.4. Efeito da temperatura na atividade enzimática	20
3.3.5. Equação de Arrhenius e energia de ativação	21
3.4. BROMELINA	22
3.5. CINÉTICA ENZIMÁTICA	29
3.5.1. A velocidade da reação	29
3.5.2. Efeito da concentração do substrato na velocidade da reação	30
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

CAPÍTULO II – Extração e preliminar caracterização da bromelina extraída das folhas do curauá (<i>Ananas erectifolius</i>) variedades branca e roxa	40
CAPÍTULO III – Estudo da atividade enzimática e estabilidade ao pH e a temperatura, da bromelina extraída das folhas do curaua (<i>Ananas erectifolius</i>) variedades branca e roxa	64
CAPÍTULO IV - CONCLUSÕES GERAIS	80
CAPÍTULO V	82
ADENDO	83
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	84
ANEXOS	85

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 3.1 – Plantação de curauá branco e roxo (Fonte: PEMATEC)	07
Figura 3.2 – Fruto do curauá (Fonte: FAPESP on line)	08
Figura 3.3 – Fibras do curauá	10
Figura 3.3.1 – Curva da atividade relativa de uma enzima em função do pH.....	19
Figura 3.3.2 – Curva da atividade enzimática relativa em função da temperatura.....	21
Figura 3.3.3 – Energia de reação não catalisada e catalisada por enzimas.....	22
Figura 3.5.1 – Conversão do substrato S em produto P ao longo do tempo	29
Figura 3.5.2 – Velocidades de reação enzimática com diferentes concentrações de substrato	30
Figura 3.5.3 – Esquema de uma reação enzimática, complexo enzima-substrato (ES) e formação de produto (P).....	31

CAPÍTULO II

Figura 1 – Electrophoretic profile of protein extracts from leaves of curaua. Samples in denaturing conditions and non-reducing. (a) polyacrylamide gel at 15% with samples of leaf extract curauá white. (b) polyacrylamide gel at 15% with samples of leaf extract curauá purple. Tracks: (LMW) marker of low molar mass: (1) crude extract, (2) two times diluted extract, (3) 3 times diluted extract, (4) four times extract diluted, (5) 5 times diluted extract;

(M) marker of bromelain, bromelain performed in a solution of commercial (Fluka, USA)
.....49

Figura 2 – Effect of pH on the proteolytic activity of bromelain extracted from curaua leaves, white and purple species.....50

Figura 3 – Effect of temperature on the proteolytic activity of bromelain extracted from curaua leaves, white and purple species52

Figura 4 – External Chart: Kinetics curve of hydrolysis of bromelain from the leaves of white curaua by azocaseina at pH 6.0 and 25°C. Internal Chart: Linearization of the kinetic data of hydrolysis of azocaseina to determine the constants by the method of Lineweaver-Burk – white curaua at pH 6.0 and 25° C.....54

Figura 5 – External Chart: Kinetics curve of hydrolysis of bromelain from the leaves of purple curaua by azocaseina at pH 6.0 and 25°C. Internal Chart: Linearization of the kinetic data of hydrolysis of azocaseina to determine the constants by the method of Lineweaver-Burk – purple curaua at pH 6.0 and 25° C55

Figura 6 – Determination of activation energy, through the effect of temperature on the enzymatic activity of bromelain extracted from purple curaua, based on the Arrhenius equation57

Figura 7 – Determination of activation energy, through the effect of temperature on the enzymatic activity of bromelain extracted from white curaua, based on the Arrhenius equation57

CAPÍTULO III

Figura 1 – Stability of the activity of bromelain from white curaua during 30 days, pH 6.0 at temperature of 5°C, -18°C and lyophilized crude extract72

Figura 2 – Stability of the activity of bromelain from purple curaua during 30 days, pH 6.0 at temperature of 5°C, -18°C and lyophilized crude extract73

Figura 3 – Stability of enzymatic activity of bromelain from white curaua at different pH74

Figura 4 – Stability of enzymatic activity of bromelain from purple curaua at different pH74

Figura 5 – Stability of enzymatic activity of bromelain from white curaua at different temperature values during 60 minutes of incubation.....76

Figura 6 – Stability of enzymatic activity of bromelain from purple curaua at different temperature values during 60 minutes of incubation.....76

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II –

Tabela 1. Kinetic parameters of Bromelain extracted from white and purple curauá.....56

LISTA DE ABREVIATURAS

AE – Atividade enzimática ou específica (U/mg).

(U/L) – Unidade de atividade por litro

K_m - Constante de Michaelis–Menten

V_{max} – Velocidade máxima da reação

V_0 – Velocidade inicial da reação

E_a – Energia de ativação

MM – Massa Molar

[S] - Concentração do substrato

[E] – Concentração da enzima

[ES] - Complexo enzima substrato

[P] - Produto

t – Tempo (min).

Δt - Intervalo de tempo

T – Temperatura (°C/K)

R- Constante dos gases

V – Velocidade da reação

FEBRAFARMA – Federação Brasileira da Indústria Farmacêutica

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. INTRODUÇÃO

A Bromelina é um conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nos vegetais da família Bromeliaceae, da qual o abacaxi é o mais conhecido. Ela apresenta diversos usos, todos baseados em sua atividade proteolítica, de grande aplicação industrial. Está presente no fruto e, principalmente no talo. Em 1891, foi estabelecida a existência da bromelina como enzima proteica digestiva, por Marcano, químico venezuelano, o qual estudou sua atividade a partir do suco de abacaxi (BALLS et al., 1941).

Os estudos que envolvem a produção de bromelina em escala industrial concentram-se na sua obtenção a partir do talo do abacaxizeiro, por esse ser um subproduto de sua exploração.

Outra planta que vem sendo estudada para a extração de bromelina é o curauá (*Ananas erectifolius* L.B. SMITH), uma monocotiledônea, pertencente à família das bromeliáceas, encontrada no Norte e Centro-oeste do Brasil. Não tem ainda sua origem claramente determinada. Muitos afirmam que tenha sido transportada das Guianas e das Antilhas para o Brasil. Outros afirmam ser o curauá originário da própria região do vale do Amazonas. A planta é conhecida desde a era pré-colombiana, cultivada por pequenos produtores e utilizada na fabricação de cordas, sacos, redes e artesanato (BERGER et al., 2003).

Segundo LEDO (1967), há ocorrência de dois tipos de curauá: um de folhas roxo-avermelhadas, que se desenvolve mais, chamado de curauá roxo; e outro de folhas verde-claras, conhecido por curauá branco.

Existe uma crescente demanda de fibras do curauá por grupos empresariais preocupados, principalmente, com a utilização de produtos naturais biodegradáveis, o que

torna essa espécie estratégica para os pequenos produtores, criando uma perspectiva de melhoria da qualidade de vida deles (LEDO,1967).

A versatilidade da planta aponta para uma potencial exploração da bromelina, com ampla aplicação na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética. A bromelina é encontrada principalmente no abacaxi, mas a quantidade produzida ainda é pequena em relação às necessidades de mercado, o que a torna um produto de alto valor comercial.

Estudos recentes da atividade enzimática em plantas de curauá demonstraram que, embora as folhas apresentem atividade significativamente menor que os frutos (que se parecem com minúsculos abacaxis), o grande volume de polpa verde (mucilagem) retirado para chegar até as fibras, e dispensado pela indústria, poderia viabilizar economicamente sua extração.

Desta forma, a determinação da atividade da bromelina em plantas de curauá, deverá proporcionar indicativos para posterior purificação da enzima e assim, proporcionar uma otimização no uso dessa planta, uma vez que o principal produto de extração é a fibra, sendo que os demais componentes são utilizados apenas como mistura na ração animal e como adubo orgânico.

A utilização desta proteína, visando às diversas aplicações biotecnológicas, está condicionada à estabilidade das enzimas nos sistemas, sendo necessário um estudo que defina as condições que não propiciem a desnaturação enzimática. Deste modo, quando a enzima já extraída é utilizada em solução, seja para fins terapêuticos, industriais ou análises clínicas, a solução enzimática deve ser preparada e armazenada em condições próprias, a fim de mantê-la estável e se possível por um período maior de tempo. Por este motivo, um dos grandes desafios na obtenção da bromelina é manter a sua estabilidade enzimática durante o processo de extração, purificação, secagem e estocagem.

Por isso, estudos vêm sendo conduzidos para identificar os mecanismos que levam à desnaturação da proteína, e com isso apontar formas de minimizar esta inativação.

Baseado nestas informações, este trabalho apresenta o estudo de caracterização da bromelina extraída do curauá, espécies roxa e branca analisando as melhores condições de estabilidade em diferentes valores de pH e temperatura.

2. OBJETIVOS

Extrair e caracterizar o conjunto de enzimas proteolíticas bromelina presente no resíduo do processamento do curauá (*Ananas Erectifolius* L. SMITH) e estudar sua estabilidade em diferentes valores de pH e temperatura.

2.1 Objetivos específicos

- Determinar o pH e a Temperatura ótimos do extrato bruto liofilizado da enzima do curauá branco e roxo;
- Estudar os parâmetros cinéticos utilizando a equação de Michaelis- Menten e modelo de Lineweaver – Burk linearizado;
- Estimar os valores da energia de ativação da enzima estudada;
- Analisar a influência do pH e da temperatura na estabilidade da enzima nas diferentes condições estudadas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Curauá

A importância das plantas doadoras de fibra na fabricação de utensílios é conhecida desde as épocas remotas pelas comunidades indígenas. Segundo MEDINA (1959), esse grupo de plantas é o segundo em importância para o homem depois das espécies alimentares. Na Amazônia, várias são as espécies produtoras de fibras, sendo o curauá (*Ananas erectifolius* L. SMITH) uma delas. Planta pré-colombiana, utilizada principalmente na fabricação de cordas, sacos e utensílios domésticos, desponta como sucedâneo para o aproveitamento de fibras. O curauá (*Ananas erectifolius* L. SMITH), é uma monocotiledônea pertencente à família das bromeliáceas, gênero *Ananas*, espécie *Ananas erectifolius*. Espécie vegetal de porte herbáceo, o Curauá é muito comum na Amazônia, mas ocorre também nos Estados do Pará, Amapá, Acre, Mato Grosso e Goiás (LEDO, 1967).

O curauá produz uma fibra de alta resistência que, quando misturada com polímeros, pode produzir um produto final com uma menor densidade, podendo ter grandes aplicações. Devido ao fato de ser reciclável e biodegradável a fibra do curauá é considerada como uma das mais promissoras entre aquelas produzidas na Amazônia brasileira (BERGER, 2003).

Há ocorrência de dois tipos de curauá: um de folhas roxo-avermelhadas, que se desenvolve mais, chamado de curauá roxo; e outro de folhas verde-claras, conhecido por curauá branco. Algumas das diferenças entre os dois tipos de curauá residem não só na coloração da folha, mas na resistência e na maciez das fibras, no porte da planta e na quantidade de rebentos e filhos. Outra diferença encontrada nos plantios de curauá é a

ocorrência, em algumas plantas, de espinhos foliares, que aparecem quando a planta entra no processo de envelhecimento (LEDO, 1967). As folhas são eretas, com dimensões de aproximadamente 5 cm de largura, 2 a 3 mm de espessura e cerca de 1,5 m de comprimento.

É uma planta de clima tropical, exigente em luminosidade e não tolera áreas sombreadas. O curauá branco tem folhas mais curtas e estreitas que o curauá roxo. Segundo BERGER (2003), o curauá branco tem fibras mais claras e fortes. O curauá roxo cresce mais rápido que o branco e também desenvolve mais massa em folhas e por isso tem maior rendimento em fibra que o curauá branco. A Figura 1 mostra uma plantação de curauá branco e roxo.



Figura 3.1 - Plantação de curauá branco e roxo (Fonte: PEMATEC)

Uma das vantagens agronômicas do curauá é que a mesma planta pode ficar de cinco a oito anos no campo dependendo da forma como foi plantada e cultivada. Um ano

após o plantio, atinge a fase adulta, em que as folhas já podem ser colhidas para uso, procedimento que pode se repetir até quatro vezes por ano (ERENO, 2007).

A Figura 3.2 mostra o fruto do curauá, muito semelhante ao abacaxi, mais amplamente conhecido, porém, em dimensões bem menores.

Estudos demonstraram o grande potencial desta planta como produtora de fibra de excelente qualidade, sendo utilizada na indústria automobilística e têxtil devido sua resistência, maciez e peso reduzido, podendo ainda ser utilizada como celulose e ração animal. Uma outra vantagem, muito valorizada por empresários é o fato da utilização de fibras naturais renováveis, que diminuem o impacto ambiental. Resultados preliminares demonstram ser a fibra do curauá comparável ao vidro, no que diz respeito à relação peso/resistência. Porém, a fibra natural é competitiva, mas não chega a possuir um custo menor que a sintética (PEMATEC).



Figura 3.2 – Fruto do curauá (Fonte: FAPESP on line)

A fibra de curauá, pelas suas propriedades mecânicas de alta resistência, baixa densidade – capaz de conferir leveza ao produto final – e potencial para reciclagem, está

sendo empregada como reforço ao plástico na fabricação de peças com características reduzidas e detalhadas, produzidas pelo processo de moldagem por injeção, como botões do painel de carros, maçanetas e dobradiças de quebra-sol. Peças de grandes dimensões, como a parte interna das portas e a tampa do compartimento de bagagem de alguns modelos de carros, já são fabricadas por um outro processo com a fibra vegetal como parte de sua composição, mas a demanda tem crescido rapidamente, muito além do que é produzido atualmente no país, reflexo do interesse despertado pela possibilidade de vários usos, com resultados comprovados, da matéria-prima extraída das folhas do curauá (*Ananas erectifolius*), que pertence à mesma família do abacaxi. Entre os usos estão caixas-d'água, piscinas, tecidos antialérgicos e até a utilização da fibra vegetal como material substituto para as vigas de ferro usadas no lugar de concreto em países como o Japão, que enfrentam problemas de tremores de terra de alta intensidade, pela sua alta resistência mecânica e leveza. A sobra da moagem da folha resulta em um produto chamado mucilagem, que pode ser usado tanto para ração animal, porque contém 7% de proteína, como na fabricação de papel pela indústria de celulose e adubo orgânico (ERENO, 2007).

Apenas na indústria automobilística, há uma demanda de aproximadamente 1000 toneladas de fibra por mês. A PEMATEC/Triangel do Brasil – empresa de São Bernardo do Campo (São Paulo) fornecedora de componentes para a Volkswagen, que é fabricante da fibra vegetal utilizada na indústria automobilística, produz atualmente 170 toneladas por mês de fibra. Em 2009, cerca de 500.000 carros saíram das linhas de montagem com o curauá. A fibra também foi adotada por fabricantes de estofados, calçados e colchões, além de continuar sendo usada pelos índios na fabricação de cordas, redes, cestarias e utensílios domésticos (Figura 3.3).



Figura 3.3 – Fibras de curauá

O processo de obtenção da fibra do curauá é semelhante ao da moagem da cana de açúcar: depois de colhida, a planta passa por uma moenda, é lavada num tanque e colocada para secar numa centrífuga. Em outra máquina, a fibra é cortada e aberta até ser transformada numa manta natural. Em seguida, a manta é prensada e está pronta para ser usada. No processo de moagem, o caldo é extraído e separado. Atualmente, apenas a fibra é utilizada na indústria, o restante é considerado resíduo e é aproveitado na ração animal (PEMATEC, 2009).

Uma enzima importante, muito utilizada na indústria farmacêutica, a bromelina, é um dos componentes principais deste resíduo do curauá. Os índios e antigos caboclos da região Norte do país há muito tempo usam o curauá para aliviar a dor e suas propriedades antiinflamatórias foram comprovadas no Departamento de Microbiologia e Farmácia da

Universidade Federal do Pará. Aprofundadas as investigações, confirmaram a sua segunda propriedade farmacológica: anestésica. De acordo com TAUSSIG e BATKIN (1988) o curauá tem sido usado para a extração de fármacos, como a bromelina, uma protease que interfere no crescimento de células malignas, inibe coágulos, tem atividade fibrinolítica e ação antiinflamatória. Além disso, pode ser usado para extração de óleos essenciais, empregados na indústria alimentícia como aromatizante e corretores de odor e sabor.

3.2 PROTEÍNAS

O nome proteína formou-se do grego proteios, que significa primeiro. Entre todos os compostos químicos, devem as proteínas certamente ser colocadas em primeiro lugar, pois são um dos principais constituintes dos organismos animais; são elas que agregam as diferentes partes do organismo e que dirigem o seu funcionamento. Encontram-se em todas as células vivas e são o principal constituinte da pele, dos músculos, dos tendões, dos nervos e do sangue, das enzimas, dos anticorpos e de muitos hormônios (MORRISON e BOYD, 1986).

As proteínas representam cerca de 50 a 80% do peso seco das células e são, portanto, o composto orgânico mais abundante da matéria viva. São encontradas em todas as partes de todas as células, uma vez que são fundamentais sob todos os aspectos da estrutura e função celulares.

Existem muitas espécies diferentes de proteínas, cada uma delas especializada em uma função biológica diversa. Quimicamente, as proteínas são altos polímeros. São poliamidas. Os monômeros de que elas se formam são os α -aminoácidos naturais. Uma única molécula de proteína contém centenas ou mesmo milhares de unidades aminoácidas. Há apenas uma vintena de unidades aminoácidas diferentes; no entanto, o número de

combinações distintas, ou seja, o número de diferentes moléculas protéicas, possíveis, é quase infinito (MORRISON e BOYD, 1986).

Todas as moléculas de uma mesma proteína apresentam, em condições fisiológicas, a mesma conformação que é denominada nativa. Essa é a conformação mais estável que a molécula pode assumir naquelas condições, e reflete um equilíbrio delicado entre as interações ocorridas no interior da molécula protéica e entre essa e seu meio ambiente. Ao proceder-se ao isolamento e purificação de uma proteína, são introduzidas alterações físico-químicas no seu meio ambiente, que podem afetar sua estrutura espacial a ponto de ocasionar a perda de sua função biológica.

Nesse caso, a proteína é dita, então, desnaturada (CAMPESE, 2004). Outra importante consequência da desnaturação de uma proteína é a perda de sua atividade biológica característica. Assim, quando uma solução aquosa de uma enzima, por exemplo, é aquecida até seu ponto de ebulição por uns minutos e depois resfriada, a enzima torna-se insolúvel e, principalmente, não mais apresenta atividade catalítica.

Cada uma das formas citadas como causa de desnaturação pode ser considerada como tratamento relativamente suave, isto é, a desnaturação pode ocorrer em condições amenas, não há necessidade de ocorrer em condições drásticas. As moléculas de proteína nativa são frágeis e facilmente desorganizadas pelo calor e outros tratamentos aparentemente suaves (YAO et al., 2002). Na maior parte dos casos, a desnaturação é um processo irreversível.

3.2.1. Desnaturação

Quando uma solução de proteína, como a albumina do ovo, é aquecida lentamente, a mesma torna-se gradualmente leitosa e logo forma um coágulo. A clara do ovo, que contém albumina, coagula pelo aquecimento num sólido branco.

Depois que o calor coagulou a clara, esta não sofre redissolução pelo resfriamento, nem forma outra vez uma solução límpida como a original. Portanto, o aquecimento transformou a ovoalbumina e, aparentemente, de forma irreversível. Esse efeito do aquecimento ocorre virtualmente com todas as proteínas, não importando seu tamanho ou função biológica, embora a temperatura exata para provocá-lo varie. A mudança irreversível provocada pelo calor e outros agentes é conhecida como desnaturação.

Há outra importante consequência da desnaturação de uma proteína, ela, quase sempre, perde sua atividade biológica característica. Assim, quando uma solução aquosa de uma enzima, por exemplo, é aquecida até seu ponto de ebulição por uns minutos e depois resfriada, a enzima torna-se insolúvel e, principalmente, não mais apresenta atividade catalítica.

A desnaturação de proteínas pode ser provocada não apenas pelo calor, mas também por valores inadequados de pH, por solventes orgânicos, por solutos como a uréia, pela exposição da proteína a alguns tipos de detergentes, pela agitação vigorosa da solução protéica até formação abundante de espuma, presença de certos íons ou sais caotrópicos na solução que contém as proteínas, oxidação, força iônica, entre outros.

3.3 ENZIMAS

A maior parte da história da bioquímica é a história da pesquisa sobre enzimas. A catálise biológica foi inicialmente descrita e reconhecida no início do século XIX, em estudos sobre a digestão da carne por secreções do estômago e a conversão do amido em açúcares simples pela saliva e por vários extratos vegetais. Na década de 50, do século XIX, Louis Pasteur concluiu que a fermentação do açúcar em álcool pela levedura é catalisada por fermentos. Ele postulou que esses fermentos, depois nomeados de enzimas, eram inseparáveis da estrutura das células vivas do levedo, uma hipótese que prevaleceu

por muitos anos. Em 1897, Eduard Buchner descobriu que extratos de levedo 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 diferentes e o estudo de suas propriedades catalíticas.

Envolvidas em todos os processos naturais que ocorrem, as enzimas, tipo especial de proteínas produzidas dentro das células dos organismos vivos, servem para auxiliar a digestão, processar nutrientes, produzir energia, dar destino a produtos residuais, rearranjar moléculas e regular uma variedade de outras funções metabólicas.

São moléculas orgânicas presentes nas células de organismos vivos, com a função específica de catalisar reações químicas. Elas aumentam a velocidade com a qual as reações atingem o equilíbrio. A enzima dá início ao aumento da velocidade de uma reação química por atuar como catalisador. Um verdadeiro catalisador aumenta a velocidade de reação, mas ele próprio não é modificado durante o processo. Nos estágios intermediários da reação, a enzima liga-se à molécula que está sendo transformada e, à medida que o produto vai sendo liberado, a enzima é regenerada na sua forma original (SAID e PIETRO, 2002).

Praticamente todas as reações químicas que se processam nos organismos são catalisadas. A catálise das reações biológicas é imprescindível para a conservação e reprodução dos seres vivos, uma vez que a maioria das reações químicas que ocorrem nos organismos tem,

na ausência de catalisadores, velocidades muito baixas. É comum encontrarem-se nas células reações que, na ausência de catalisadores, demoram várias horas, dias ou anos para se completarem ou terem velocidades iguais a zero, quando medidas em tempo finito (TORRES, 2001).

De acordo com LEHNINGER et al. (2002), a maioria das moléculas biológicas é muito estável no ambiente aquoso de pH neutro e temperatura moderada encontrado no interior das células. Muitas reações bioquímicas comuns envolvem eventos químicos que são demasiadamente improváveis nas 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.

O estudo das enzimas também tem imensa importância prática. Em algumas doenças, especialmente nas desordens genéticas herdadas, pode ocorrer nos tecidos, a deficiência, ou mesmo a ausência total, de uma enzima ou mais. As enzimas tornaram-se importantes ferramentas práticas, não apenas na Medicina, mas também na indústria química, no processamento de alimentos e na agricultura. Essas tomam parte até mesmo nas atividades do dia a dia do lar, como na preparação de alimentos e na limpeza doméstica (LEHNINGER et al., 2002).

A maior parte das enzimas produzidas industrialmente tem aplicação na produção, conservação e modificação de produtos animais e vegetais (em especial os alimentos), na produção de medicamentos (vitaminas e hormônios) e na produção de derivados de matérias primas animais e vegetais. Em todos os casos de aplicação citados, trata-se fundamentalmente de imitar tecnologicamente o que é feito na natureza, embora em escala condicionada à necessidade e à vontade do homem (KIELING, 2002).

Os vegetais são limitados como fonte de enzimas, uma vez que geralmente a quantidade de enzima, que pode ser extraída de uma grande massa vegetal, é bem pequena; isso se torna economicamente viável apenas aonde a mão de obra e a terra têm baixo custo. Nessas condições, poucas são as enzimas que podem ser obtidas, entre elas, as proteinases, papaína, bromelina e ficina.

3.3.1 Propriedades gerais

As enzimas são catalisadores biológicos que aumentam a velocidade das reações químicas sem se alterar. Os catalisadores biológicos apresentam variadas diferenças em relação aos catalisadores químicos. Quando uma reação química é catalisada por enzimas, a sua velocidade de reação é várias ordens de grandeza mais rápida que uma reação catalisada por um catalisador inorgânico. As condições de reação tornam-se mais suaves e energeticamente mais favoráveis, uma vez que as enzimas atuam em temperaturas mais baixas (abaixo de 100°C), a valores pH mais próximos da neutralidade e à pressão atmosférica, enquanto os catalisadores químicos requerem frequentemente temperaturas e pressões elevadas e valores extremos de pH. São regiões estéreo-seletivas, o que se traduz na formação de produtos enantiomericamente puros.

Têm ainda a capacidade de acelerar em ambos os sentidos uma reação reversível. Os catalisadores biológicos detêm a capacidade de regulação, as atividades catalíticas de muitas enzimas variam em função da concentração do substrato. O controle alostérico, ou seja, a modificação covalente das enzimas e a variação da quantidade de enzima sintetizada é um dos mecanismos usados na regulação enzimática (CABRAL et al., 2003).

A enorme especificidade das enzimas relativamente aos substratos com que podem interagir e o fato de serem moléculas protéicas (geralmente grande relativamente ao tamanho do substrato), levaram à introdução do conceito de centro ativo ou centro catalítico. Este é definido como uma pequena zona da enzima efetivamente envolvida no processo catalítico, é o local específico e tridimensional da proteína que permite a interação específica com o (s) substrato (s) e onde ocorre a reação química.

O modelo tradicional de complementaridade estrutural ou —chave-fechadura, baseia-se na especificidade da ação enzimática e pressupõe que o substrato e o centro ativo

terão formas complementares, existindo portanto um encaixe perfeito. O segundo modelo diz respeito ao modelo de encaixe, ou ajuste, induzido. Foi introduzido, cerca de 50 anos depois do modelo —chave-fechadura por Koshland de modo a explicar a atuação de determinadas enzimas. Neste modelo quando os substratos interagem com a enzima, provocam estas modificações conformacionais que ocorrem não só no centro ativo, mas também podem ocorrer no restante da estrutura proteica (PEREIRA, 2010).

Um sistema de reação enzimática é quantificado pela medição da atividade da enzima, sendo este um aspecto essencial na caracterização de um sistema. A atividade enzimática é determinada a partir de curvas de reação, que mostram uma diminuição na velocidade de reação ao longo do tempo. Esta diminuição pode ser ocasionada por variadas causas: a inibição da enzima pelo produto; o consumo de substrato, que origina a diminuição do grau de saturação da enzima; a desativação da enzima incitada pelo pH, temperatura e outros; o aumento da velocidade da reação inversa à medida que se acumulam produtos de reação (CABRAL et al., 2003).

3.3.2 Estabilidade estrutural

A estabilidade estrutural das enzimas é determinada por uma variedade de forças físicas, que resultam de interações, que ocorrem dependendo da disposição e orientação dos grupos funcionais da molécula. A conservação das ligações covalentes é indispensável para a manutenção da estrutura terciária de uma enzima. As forças de Van der Waals também são determinantes no que toca à estrutura das proteínas. É o elevado número de interações dipolo-dipolo, que embora apresentem uma energia associada relativamente baixa, apresenta um papel importante na estabilidade enzimática. No entanto, as interações eletrostáticas no geral contribuem pouco para a estabilidade, já que se encontram, na maioria, à superfície da molécula, em maior contato com o solvente. As pontes de

hidrogênio inter-moleculares são responsáveis pela estrutura tridimensional das enzimas, portanto contribuem bastante para a estabilidade destas.

Tendo em conta que as pontes de hidrogênio e as interações eletrostáticas podem ocorrer, do mesmo modo, entre as moléculas proteicas e as moléculas de solventes polares como a água, as interações hidrofóbicas tornam-se mais favoráveis energeticamente. Estas interações fazem com que os grupos hidrófobos estejam orientados para o interior da molécula, repelindo o solvente. Apresentam assim, um papel essencial na manutenção da estabilidade da estrutura terciária das proteínas (CABRAL et al., 2003).

3.3.3 Efeito do pH na atividade enzimática

As enzimas são ativas numa banda restrita de pH e na maioria dos casos existe um pH ótimo para cada enzima, em que a sua atividade catalítica é máxima. O poder catalítico de cada enzima depende da conformação tridimensional da molécula, em particular do centro ativo. Uma vez que as enzimas são constituídas por aminoácidos, o pH vai influenciar diretamente a ionização destes. Os grupos ionizáveis, presentes no centro ativo, atuam normalmente como ácidos ou bases gerais, ou como nucleófilos em reações catalisadas enzimaticamente. Uma pequena alteração no pH impede que esses grupos continuem carregados, logo não se forma o complexo ES. Assim um pequeno desvio, nos valores de pH, pode provocar uma alteração ao nível do centro ativo, impedindo que a reação catalítica ocorra. A forma da curva de atividade de uma enzima em função do pH apresenta-se normalmente em forma de sino, como se pode ver na Figura 3.3.1.

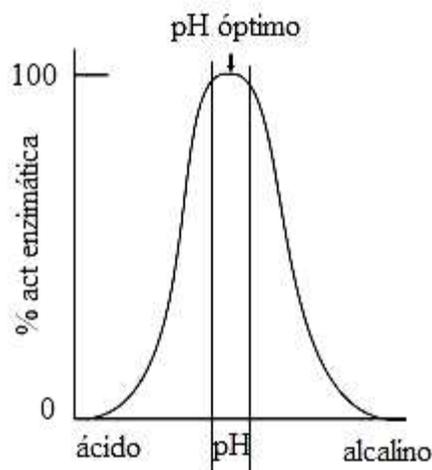


Figura 3.3.1. Curva da atividade relativa de uma enzima em função do pH

Assim, podem verificar-se dois efeitos distintos do pH na atividade enzimática. Quando se usam valores de pH próximos do ótimo, podem levar a uma diminuição na atividade da enzima, no entanto estes efeitos são normalmente reversíveis. O uso de valores extremos de pH podem resultar numa perda total de atividade enzimática, valores de pH extremos têm como consequência o desenrolamento irreversível da proteína e portanto a sua desnaturação.

Nem todas as enzimas apresentam o mesmo pH ótimo. Cada sistema apresenta um pH adaptado ao ambiente em que se insere. Na natureza, cada organismo controla, de modo eficiente, o pH, utilizando para isso um sistema tampão. É importante a nível laboratorial que se inclua em qualquer ensaio um sistema tampão, de modo a estabilizar o pH das soluções e impedir que este se altere, com o recorrer das reações, podendo assim estudar o comportamento das enzimas a um pH estável (CABRAL et al., 2003; JÚNIOR, 2001).

3.3.4 Efeito da temperatura na atividade enzimática

Tal como nas reações químicas, nas reações catalisadas por enzimas, o aumento da temperatura leva a um aumento da velocidade de reação. O aumento da temperatura aumenta a probabilidade de colisão entre as moléculas e faz com que uma maior quantidade

de moléculas tenha energia de ativação suficiente para que a reação ocorra. No entanto, este efeito positivo do aumento da temperatura é contrariado pela desnaturação das enzimas. A combinação de estes dois efeitos dá origem a uma temperatura ótima para cada enzima, como se pode verificar na Figura 3.3.2.

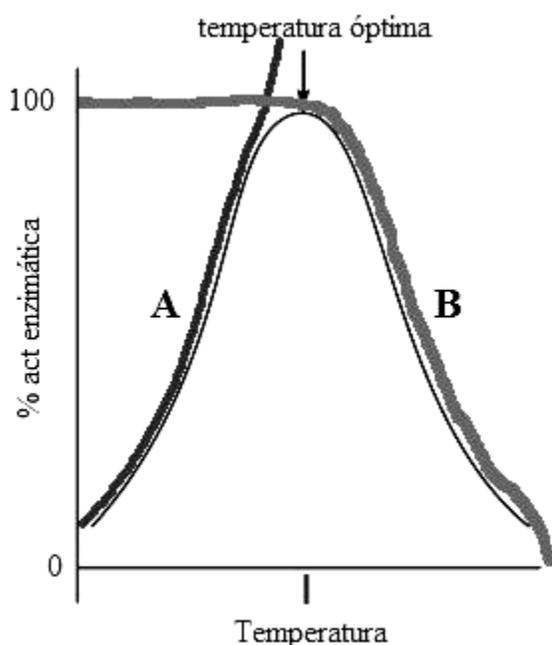


Figura 3.3.2. Curva da atividade enzimática relativa em função da temperatura. Resulta da combinação de dois fatores: A – o aumento da velocidade de reação pelo aumento da temperatura; B – a inativação das moléculas com o aumento da temperatura.

Esta temperatura ótima evidenciada na Figura 3.3.2 depende do tempo escolhido para a realização das medições. Assim, a verdadeira temperatura ótima para a determinação da atividade de uma enzima, corresponde à temperatura máxima, na qual a enzima possui atividade catalítica constante, por um período de tempo pelo menos tão longo quanto o tempo da determinação (CABRAL et al., 2003; JÚNIOR, 2001).

3.3.5 Equação de Arrhenius e energia de ativação

A equação de Arrhenius, Eq. 1, sugerida pelo químico com o mesmo nome, surge como meio de determinar a dependência da constante cinética com a temperatura. Esta

equação considera que a constante de velocidade de reação varia exponencialmente com o inverso da temperatura. Este efeito foi verificado empiricamente, adequando com grande exatidão os dados experimentais, num intervalo relativamente grande de temperaturas.

$$k = k_0 \times e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad \text{Eq.1}$$

Onde, E_a corresponde à energia de ativação (J/mol), R é a constante dos gases ideais (8,314 J/molK), T a temperatura (K) e k_0 o fator pré-exponencial. A linearização da equação de Arrhenius permite determinar a energia de ativação. A energia de ativação é a energia necessária para que a reação ocorra. Para que uma reação química ocorra é necessário que duas moléculas, na mesma solução, se encontrem e que colidam entre elas, para isso é necessário que exista uma quantidade mínima de energia. A energia de ativação refere-se também à energia necessária para romper com ligações químicas, existentes entre os átomos de cada molécula, para que se formem novas moléculas. Uma reação catalisada por enzimas faz com que a energia de ativação necessária para que a reação ocorra seja menor, daí que a velocidade de reação aumente. A Figura 3.3.3 ilustra a diferença entre uma reação não catalisada e uma reação catalisada por enzimas (FOGLER, 2005).

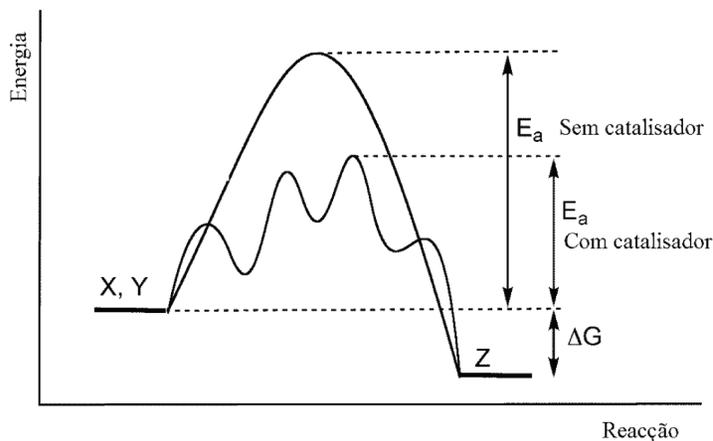


Figura 3.3.3. Energia de reação não catalisada e catalisada por enzimas (adaptado de FOGLER, 2005)

3.4. BROMELINA

Bromelina é o nome genérico dado ao conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nos vegetais da família Bromeliaceae, da qual o abacaxi é o mais conhecido. As enzimas proteolíticas encontradas nos talos recebem o nome de bromelina do talo e tem o número sistemático EC 3.4.22.4, e as encontradas no fruto são chamadas de bromelina do fruto ou ainda, bromelina e tem o número sistemático EC 3.4.22.5. A bromelina é uma glicoproteína, tendo um resíduo oligossacarídeo por molécula, que está covalentemente ligado à cadeia peptídica. A bromelina do talo é uma enzima sulfidrílica, e este grupamento é essencial para a sua 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).

ROWAN et. al. (1990) descreve a presença de quatro proteases principais presentes em abacaxis (*Ananas comosus*): bromelina do fruto, bromelina do talo, ananaína e comosaína. A bromelina do fruto tem uma atividade proteolítica maior que a bromelina do talo em diversos substratos protéicos e sua atividade é máxima em pH 8,0 e a temperatura de 70°C. A bromelina do talo apresentou atividade máxima a 60°C e pH 7,0. A forma da bromelina comercialmente encontrada é a bromelina do talo, apesar da grande quantidade de resíduos de abacaxi fruto proveniente das indústrias de conserva de abacaxi (CÉSAR, 2005).

A matéria-prima mais empregada para obtenção de bromelina são os talos maduros de abacaxizeiros, ao serem utilizados após a colheita das frutas; no entanto, podem ser usadas também folhas, suco, cascas e resíduos. A bromelina aparece em maior concentração na porção inferior dos talos de plantas maduras. A porção central do talo

contém mais proteases do que a porção mais externa (BALDINI et al., 1993). Já HEINICKE e GORTNET (1957) afirmaram que os talos imaturos mais novos e suculentos não possuem ou apresentam baixos teores de bromelina.

De acordo com CESAR (2005), a enzima não está presente nos primeiros estágios de desenvolvimento do fruto e seu nível aumenta rapidamente; assim, mantém-se elevado até o amadurecimento, quando tem pequeno decréscimo. Essa é uma das vantagens da utilização das proteases do abacaxi (*Ananas comosus*) em comparação com outras proteases vegetais. O abacaxi é o único fruto que possui concentrações relativamente altas de proteases no estado maduro, mesmo com diminuição de sua atividade proteolítica na maturação. No figo e no mamão, a ficina e papaína são encontradas em níveis elevados apenas no fruto verde, sua concentração de protease desaparece com o seu amadurecimento.

No abacaxi, diferentes partes da planta podem ser usadas como matéria-prima para a obtenção da bromelina: folhas, talos, polpa da fruta, cascas e resíduos industriais do processamento do fruto (CESAR, 2005). OMAR et al. (1978) e TISSEAU (1976) determinaram o rendimento de bromelina em diversas partes do abacaxizeiro e verificaram que o talo apresentou valores muito superiores que o fruto, o cilindro central, a casca e a polpa.

Os usos da bromelina são diversos, todos baseados em sua atividade proteolítica. As medidas de concentração de soluções, expressas em unidades de massa por unidade de volume, não têm aplicação para soluções enzimáticas, já que para essas o que importa não é a massa, mas a atividade, que é avaliada pela velocidade da reação que a enzima catalisa. Dada a especificidade das enzimas, essa medida é possível, mesmo na presença de outras proteínas. Para efetuar tais dosagens, uma amostra da solução que contém a enzima é

incubada com concentrações altas de substratos (para garantir a velocidade máxima e impedir que pequenas variações na concentração do substrato possam afetar as medidas). A velocidade da reação é medida e expressa em Unidades Internacionais. Uma Unidade Internacional (U) é a quantidade de enzima capaz de formar 1 μmol de produto por minuto em condições ótimas de medida (pH, temperatura, etc.), especificadas para cada caso (TORRES, 2001).

Estudos feitos por BECZE (1970), GREENBERG (1965), JOHNSON (1977), MURACHI E NEURATH (1960), YAMAMOTO (1975) e WIELAND (1972) comprovam sua utilização em indústrias alimentícias e farmacêuticas. Pode-se mencionar sua utilização no amaciamento de carnes, na clarificação de cervejas, na fabricação de queijos, no preparo de alimentos infantis e dietéticos, no pré-tratamento de soja, no tratamento do couro, na indústria têxtil, no tratamento da lã e da seda, no tratamento de distúrbios digestivos, feridas e inflamações, preparo de colágeno hidrolisado, etc. (BORRACINI, 2006). De acordo com ROWAN et al. (1990), a bromelina do fruto tem atividade proteolítica maior que a bromelina do talo em diversos substratos proteicos, e sua atividade é máxima em pH 8,0 e 70°C de temperatura, enquanto a bromelina do talo apresentou atividade máxima em pH 7,0 e 60 °C .

A forma de bromelina comercialmente encontrada é a obtida do talo, apesar da grande quantidade de resíduos do abacaxi, fruto proveniente das indústrias de conservas de abacaxi (CESAR, 2005). As preparações de bromelina são impuras, e geralmente as principais enzimas contaminantes são outras enzimas proteolíticas e enzimas não proteolíticas, tais como: fosfatases, peroxidases, celulasas e outras glicosidases (MURACHI, 1976).

MURACHI (1976) purificou a bromelina do talo de abacaxi por cromatografia de gel-filtração e determinou a massa molar da fração pura de 28 kDa, por SDS-PAGE. SUH et al. (1992) purificaram a bromelina do fruto (18 vezes de aumento de pureza) e do talo (46 vezes de aumento de pureza) até a homogeneidade, por cromatografia de gel-filtração e determinaram as massas molares de 32.5 e 37 kDa, respectivamente, com rendimento de 23% em atividade. Conforme descrevem ROWAN et al. (1990), são quatro as proteases principais presentes no abacaxi (*Ananas comosus*): bromelina do fruto, bromelina do talo, ananaína e comosaína.

CESAR (2000) estudou a extração da bromelina do fruto do abacaxi e utilizou sistema bifásico formado por PEG/sal (fosfato de potássio). Os resultados mostraram-se promissores, com um coeficiente de partição de aproximadamente 3,9 para pH 9,0, PEG 1500 e com concentrações de 17,5% do PEG e 15% do sal.

Estudos feitos por Ferreira (2007) na extração da bromelina da casca e talo do abacaxi, que também utilizou sistema bifásico formado por PEG/sal (fosfato de potássio), indicaram bons resultados quando o pH era alto (9,0, 10,0 e 11,0), para PEG 4000 e concentrações de 50% do PEG e 15% do sal.

A principal aplicação da bromelina produzida no Brasil é a indústria farmacêutica, que investe em pesquisas de novos produtos. De acordo com a Federação Brasileira da Indústria Farmacêutica – Febrapharma (2009), os investimentos em 2008, nesse segmento, foram estimados em R\$1,72 bilhão. Isso significa acréscimo de 14,8% sobre o total anunciado em 2007. Desse total, quase 30% - cerca de R\$ 505 milhões - seriam destinados à área de pesquisa e desenvolvimento.

Introduzida pela primeira vez como composto terapêutico em 1957, a ação da bromelina inclui: inibição da agregação plaquetária, atividade fibrinolítica, ação anti-

inflamatória, ação antitumoral, modulação de citocinas e imunidade, propriedade debridante de pele, aumento da absorção de outras drogas, propriedades mucolíticas, facilitador da digestão, 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. Apesar de todos os seus mecanismos de ação ainda não estarem totalmente esclarecidos, foi demonstrado que é um seguro e efetivo suplemento. A bromelina parece ter tanto ação direta quanto indireta, envolvendo outros sistemas enzimáticos, ao exercer seus efeitos antiinflamatórios (Mattos, 2005).

MAURER (2001) efetuou estudos com talos e frutos de abacaxi e comprovou que estão presentes, entre outros componentes, várias proteinases, demonstrou *in vitro* e *in vivo* atividades anti-inflamatórias, antiedemas e antitromboses.

Segundo MEINIG (1999), o primeiro efeito da bromelina relatado foi como digestivo, ao serem substituídas a pepsina e a tripsina em tratamentos de insuficiência pancreática. É utilizada também no tratamento de cardiopatias, artrite reumatóide, traumas cirúrgicos, edemas, sinusites; devido, principalmente, à sua capacidade de facilitar a coagulação sanguínea, por diminuírem os edemas e também por apresentar efeito anti-inflamatório. Faz parte de componentes ativos de fármacos que ativam a circulação sanguínea e respiração, pois suprimem os depósitos protéicos em veias e artérias. Nas terapias contra o câncer, é utilizada no aumento de lises de células cancerosas. Recentemente, tem sido relatado que as proteases extracelulares têm papel específico regulatório na modulação da resposta imune e também pode agir como sinalizadora em processos de mutagêneses (MYNOTT et al., 1999). A bromelina promove o aumento nos níveis de antibióticos quando administrada concomitantemente a eles (LOTZ-WINTER,

1990). Também é usada em forma de solução para preparação de suspensão de hemácias a ser utilizada na tipagem sanguínea.

É empregada também nas indústrias de alimentos, no amaciamento de carne, já que degrada suas proteínas conjuntivas; na produção de biscoitos a partir de farinhas de trigo com alto teor proteico; na produção de ovos desidratados; na preparação de leite de soja e isolados proteicos; nas cervejarias, para clarificação da cerveja, hidrolisando certos complexos proteínastaninos formados durante a fermentação (FREIMAN E SRUR, 1999). É usada no tratamento de couros, nas indústrias têxteis para amaciamento de fibras e também na produção de detergentes.

MICHELINI (2003) fez estudos de mensuração da atividade da bromelina em plantas de curauá e verificou que a folha, tanto na cultivar branco quanto roxo, apresenta teores menores de atividade enzimática em relação ao fruto 27,4% e 36,18%, respectivamente. Esses valores se aproximam dos valores encontrados por Cesar et al. (1999) ao trabalharem com talo, casca e fruto de abacaxi. O potencial de obtenção da bromelina do curauá também pode ser igualmente significativo, já que, de acordo com Leão et al. (1998), as fibras representam em torno de 5 a 8% da planta, e o restante é considerado resíduo.

Ainda segundo estudos feitos por MICHELINI (2003), a atividade enzimática observada no fruto do curauá mostrou grande variação durante os estágios de seu desenvolvimento: é crescente até a maturidade e decresce a partir daí. Essa observação é coerente com aquela verificada por BALDINI et al. (1993), que não encontraram atividade enzimática nos primeiros estágios de desenvolvimento do fruto do abacaxi; entretanto, seu nível aumentava rapidamente e mantinha-se elevado até que, por ocasião do amadurecimento, decrescia ligeiramente, e houve queda marcante de atividade da protease

durante o período final da maturação. De acordo com GORTNER E SINGLETON (1965); MOORE E CAYGILL (1979) e SUBRAMANIAN et al. (1978), parece razoável supor que no abacaxi a bromelina seja transformada em outra proteína com função metabólica diferente, como enzima produtora de sabor e aroma, uma vez que os constituintes voláteis responsáveis pelo aroma são formados quando a atividade de protease está diminuindo.

3.5 CINÉTICA ENZIMÁTICA

3.5.1 A velocidade de reação

A velocidade de uma reação química é uma medida da conversão de reagente (s) em produto (s) por unidade de tempo. As reações químicas apresentam velocidades diferentes, avaliadas pelo consumo de reagentes ou pela variação da quantidade de produtos formados, num dado intervalo de tempo. Nas reações catalisadas por uma enzima (E), os reagentes designam-se substratos (S) e a sua conversão num produto (P) pode reconhecer-se na Figura 3.5.1

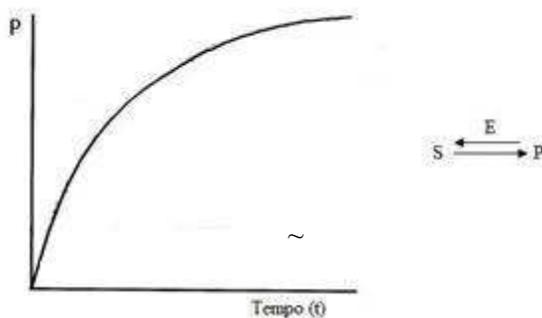


Figura 3.5.1 Conversão do substrato S em produto P ao longo do tempo.

De acordo com a Figura 3.5.1 pode-se verificar que a velocidade de reação é mais elevada no início e que esta velocidade vai decrescendo ao longo do tempo. Assim acontece devido do fato de que à medida que se vai formando o produto, a reação inversa começa a

aparecer. Logo, existe uma vantagem em medir velocidades apenas nos momentos iniciais, em que a variação de substrato não é significativa e assim considera-se a quantidade de produto formado nula, não havendo necessidade de considerar a reação inversa (CABRAL et al., 2003; JÚNIOR, 2001).

Assim, num determinado tempo, a velocidade de reação é dada pela Eq 2.:

$$V = \frac{\text{Produto formado}}{\text{tempo}} = \frac{\Delta P}{\Delta t} = -\frac{\Delta S}{\Delta t} \quad \text{Eq.2}$$

No caso em que são estudadas apenas as velocidades iniciais (V_0), num intervalo de tempo inicial (Δt_0), esta equação transforma-se na Eq. 3.:

$$V_0 = \frac{\Delta P}{\Delta t_0} \quad \text{Eq. 3}$$

3.5.2 Efeito da concentração de substrato na velocidade de reação

A concentração de substrato, [S], numa reação enzimática, afeta a velocidade de reação, na medida em que aumentando a concentração [S] a velocidade de reação tende a aumentar, obtendo-se, entre este e a velocidade inicial, uma relação hiperbólica. Assim os valores da velocidade de reação, quando se aumenta a concentração de substrato, tendem para um valor máximo, aproximando-se duma cinética de ordem zero, em que a velocidade é independente de [S]. Este fato pode ser notado na Figura 3.5.2.

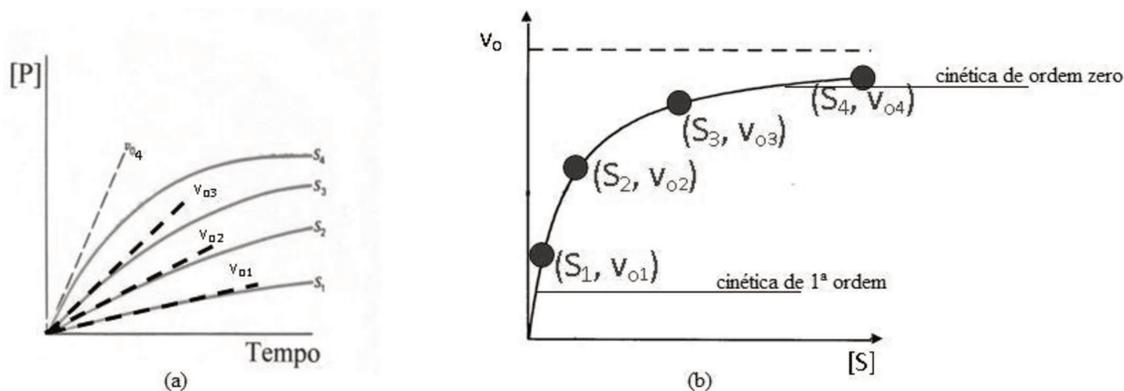


Figura 3.5.2 (a) Velocidades de reação enzimática com diferentes concentrações de substrato; (b) Perfil hiperbólico da relação entre a concentração de substrato [S] e a velocidade de reação inicial v_0 (curva de Michaelis-Menten, que representa o comportamento enzimático mais comum)

O complexo enzima-substrato (ES) como intermediário de reações enzimáticas, ilustrado na Figura 3.5.3 é o responsável pelo perfil hiperbólico da curva Michaelis-Menten.

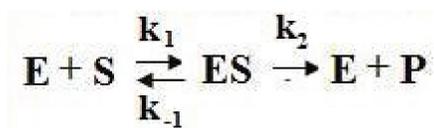


Figura 3.5.3 Esquema de uma reação enzimática, complexo enzima-substrato (ES) e formação de produto (P).

A teoria de Michaelis-Menten é uma simplificação, válida para a maioria das enzimas. Nos instantes iniciais da reação a quantidade de produto formada é zero, o que torna unidirecional o segundo passo da reação. Quando a concentração de substrato torna-se suficientemente elevada para converter toda a enzima no complexo (ES), o segundo passo da reação torna-se limitante, de modo que a velocidade global de reação se torna cada vez mais insensível ao aumento de [S], aproximando-se assim de uma assíntota (velocidade máxima, V_{max}). Este comportamento pode ser traduzido pela Eq. 4 (Equação de Michaelis-Menten):

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Eq.4}$$

Em que V_0 é a velocidade inicial para cada concentração de substrato [S], V_{max} a velocidade máxima e K_m a constante de Michaelis (ou constante de equilíbrio de dissociação do complexo ES). A constante de Michaelis engloba as constantes k_1 , k_2 e k_{-1}

que são constantes, logo, K_m não varia com a quantidade de enzima e é portanto uma característica da atividade dessa enzima. É assim, uma medida da afinidade do substrato em relação à enzima, ou seja, quanto maior o seu valor menor será a afinidade. A velocidade máxima, V_{max} , que é igual a $k_1[E]$ e portanto é constante apenas para uma concentração de enzima fixa, é o valor para o qual tende a velocidade à medida que se aumenta a concentração de substrato. Corresponde à situação experimental em que todos os centros ativos das moléculas de enzima estão saturados de substrato. K_m iguala a concentração de substrato quando dividimos V_{max} por dois. A constante de Michaelis é assim igual à concentração de substrato para a qual a velocidade de reação é metade da sua velocidade máxima. Posto isto, pode-se afirmar que a eficiência catalítica máxima de uma enzima é atingida a uma baixa concentração de substrato, quando o valor da constante de Michaelis é baixo (CABRAL et al., 2003; JÚNIOR, 2001).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDINI, V.L.; IADEROSA, M.; FERREIRA, E.A.; SALES, A.M.; DRAETTA, I.S.; GIACOMELLI, E.J. Ocorrência da bromelina em espécies e cultivares de abacaxizeiro. Colet. ITAL, Campinas, v. 23, p. 44-55, 1993.

BALLS, A. K.; THOMPSON, R.R.; KIES, M.W. Bromelain. Properties and Commercial production. Industrial e Engineering Chemistry, v. 33, p. 950-953, 1941.

BECZE, C.G. Food enzymes. CRC Critical Reviews in Food Technology. Cleveland, v. 1, p. 479-518, 1970.

BERGER, N. Agronomische Optimierung des Anbaus von Curauá (*Ananas lucidus* Miller) in der östlichen Amazonas Region von Brasilien. Relatório de Conclusão do Projeto de Pesquisa. Universidade de Hohenheim, DaimlerChrysler AG e DaimlerChrysler do Brasil. Hohenheim, 2003.

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

CABRAL, J.M.S.; AIRES-BARROS, M.R. Reversed micelles in liquid-liquid extraction. In: Recovery processes for biological materials. KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S. (ed). New York: John Wiley e Sons, 1993.

CABRAL J.M.S., AIRES-BARROS M.R., GAMA M. Engenharia Enzimática, LIDEL - Edições Técnicas, Ltda. Lisboa. pp. 1-57, 2003.

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

CESAR, A. C. W. Otimização dos parâmetros de extração líquido-líquido em duas fases aquosas na recuperação da bromelina presente no abacaxi. Dissertação de Mestrado. Campinas, SP, Brasil, FEQ/UNICAMP, 2000.

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

ERENO, D. Leve e resistente. Curauá substitui fibra de vidro em peças de carro e entra na composição de vigas à prova de terremotos. Pesquisa FAPESP online. Ed. 141 - Novembro 2007. Disponível em: <<http://www.revistapesquisa.fapesp.br/?art=3391ebd=1epg=1elg>>. Acesso em: set 2008.

FEBRAFARMA. Disponível em: <<http://www.protec.org.br/noticias.asp?cod=1187>>.

Acesso em jan 2009.

FERREIRA, J.F. Caracterização e purificação da enzima bromelina em sistema de duas fases aquosas PEG/Fosfato. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007. Tese (Mestrado).

FREIMANN, L.O.; SABAA SRUR, A.U.O. Determinação de proteína total e escore de aminoácidos de bromelinas extraídas dos resíduos do abacaxizeiro (*Ananas comosus*, (L.) Merrill.). Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v. 19, n. 2, p.170-173, 1999.

FOGLER, H.S. Elements of Chemical Reaction Engineering, in: P. Hall (Ed.). Nova Jérsei. pp. 92-98, 2005.

GORTNER, W.A.; SINGLETON, V.L. Chemical and physical development of the pineapple fruit. nitrogenous and enzyme constituents. Journal of Food Science, Chicago, v. 30, n.1, p. 24-9, 1965.

GORTNER, W.A.; SINGLETON, V.L. Chemical and physical development of the pineapple fruit. nitrogenous and enzyme constituents. Journal of Food Science, Chicago, v. 30, n.1, p. 24-9, 1965.

GREENBERG, D.M. Plant proteolytic enzymes. In: Colowick, S.P. e Kaplan, N.O. Methods in enzymology. New York: Academic Press, v. 1, p. 54-64, 1965.

JOHNSON, J.C. Industrial enzymes: recent advances. New Jersey: Noyes Data Corporation, 1977.

JÚNIOR A.F. Enzimas e as suas aplicações-cinética enzimática, Universidade Federal de Santa Catarina, 2001.

KIELING, D.D. Enzimas, aspectos gerais. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, UFSC, Florianópolis, 2002.

LEÃO, A.L., TAN, I.H., CARASCHI, J.C. Curaua fiber – A tropical natural fibers from Amazon - Potential and application in composites. International Conference on Advanced Composites, pp. 557–564, Hurghada, Egito, 1998.

LEDO, I.A.M. O cultivo do curauá no Lago Grande da Franca. Banco de Crédito da Amazônia S/A, 1967.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de bioquímica. 3. ed. São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos LTDA, 2002.

LOTZ-WINTER, H. On the pharmacology of bromelain: An update with special regard to animal studies on dose-dependent effects. *Planta Medica*, v. 56, n. 3, p. 249- 253, 1990.

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. Bromelain: Biochemistry, pharmacology and medical use. *Cell Mol Life Sci*, v. 58, p. 1234–1245. 2001.

MEINIG, G.E. Bromelain. *Phytomedicine*, v. 2, p. 1-2, 1999.

MEDINA, J.C.; BLEIINTROTH, W.E.; HASHIZUME, T.; Abacaxi – da cultura ao processamento e comercialização, ITAL, 1978.

MICHELINI, J. Atividade de bromelina em plantas de curauá (*Ananas erectifolius* L.B.Smith) em diferentes condições físico-químicas, na fase de extração da fibra. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2003. Relatório de Iniciação Científica.

MOORE, D.J.; CAYGILL, J.C. Proteolytic activity of malaysian pineapple. *Tropical Science*, London, v.21, n.2, p.97-102, 1979.

MORRISON, R.T.; BOYD, R.N., Química orgânica. 8. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1986.

MURACHI, T. Bromelain enzymes. In: *Methods in Enzymology*, vol. XLV. New York: Ed. L. Lorand, Academic Press, p. 475-485, 1976.

MURACHI, T.; NEURATH, H. Fractionation and specificity studies on stem bromelain. *Journal of Biological Chemistry*, v. 235, n. 1, p. 99-107, 1960.

MYNOTT, T.L.; LADHAMS, A.; SCARMATO, P.; ENGWERDA, C.R. Bromelain, from pineapple stems, proteolytically blocks activation of extracellular regulated kinase-2 in T cells. *Journal of Immunology*, v. 163, p. 2568-2575, 1999.

OMAR, S.; IDRUS, A.Z.; RAZAK, O.A. Extraction and activity of bromelain from pineapple. *Mardi Research Bulletin, Malásia*, v.6, n.2, p.172-9, 1978.

PEMATEC. Projeto Curauá. Disponível em <http://www.pematecpara.com.br/projeto.asp>. Acesso em: jul. 2009.

PEREIRA, J.A.N. Estudo da atividade, estabilidade e cinética enzimática da lacase em líquidos iônicos. Universidade de Aveiro, Departamento de química, Portugal, 2010. (Tese de mestrado).

ROWAN, A.D.; BUTTLE, D.J., BARRETT, A.J. The cysteine proteinases of the pineapple plant. *Biochemical Journal*, v. 266, n. 3, p. 869-875, 1990.

SAID, S.; PIETRO, R. Enzimas de interesse industrial e biotecnológico. Rio de Janeiro: Editora Eventos, 2002.

SUBRAMANIAM, N.; CARTAXO, M.E.Q.; SUBRAMANIAM, S.; FARIAS, J.L. Study of bromelain present in the pineapple plant of Paraíba. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v. 30, n.11, p. 373-8, 1978.

SUH, H.J.; LEE, H.; CHO, H.Y.; YANG, H.C. Purification and characterization of bromelain isolated from pineapple, v. 35, p. 300-307, 1992.

TAUSSIG, S.J.; BATKIN, S. Bromelain, the enzyme complex of pineapple (*Ananas comosus*) and its clinical application. An update. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 22, n. 2, p. 191-203, 1988.

TISSEAU, R. Activité proteolytique de l'ananas utilisé em conserverie et de ses déchets. *Fruits*, Paris, v. 31, n. 6, p. 373-378, jun. 1976.

TORRES, B.B. Elementos de enzimologia. In: *Biotecnologia Industrial. Volume I. Fundamentos*. Cood: BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. 1. ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001.

WIELAND, H. *Enzymes in food processing and products*. New Jersey, Noyes Data Corporation, 1972.

YAMAMOTO, A. Proteolitic enzymes. In: Reed, G. *Enzymes in food processing*. 2. ed. New York: Academic Press, 1975.

YAO C.Y.; TANG S.K.; ZHANG J.H.; YU Y.T. Kinetics of lipase deactivation in aot/isooctane reversed micelles. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, v. 18, n. 4, p. 279-284, 2002.

CAPÍTULO II

**Extração e preliminary caracterização da bromelina extraída do
curauá (*Ananas erectifolius*) branco e roxo**

Manuscrito submetido à revista *Biotechnology Letters*

RESUMO

O presente trabalho relata a caracterização e determinação de parâmetros cinéticos de bromelina extraídas de curauá (*Ananas erectifolius*) variedades branco e roxo. O pH e a temperatura ótima para a atividade proteolítica da bromelina do curauá foram determinados utilizando como substrato azocaseína: (pH 4,0-10,0 a 5°C - 100°C). A enzima estudada mostrou atividade ótima em pH 6,0 para o curauá branco e 6,0 e 7,0 para o curauá roxo, e em 40° C e 60°C para o branco e 40°C para o curauá roxo. O menor resultado de K_m e o maior resultado de V_{max} / K_m foram encontrados para o curauá roxo, mas as duas variedades mostraram afinidade pelo substrato azocaseína, com valor de K_m 185,18 $\mu\text{mol.L}^{-1}\text{min}$, V_{max} de 158,73 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e energia de ativação de 13.903 cal/mol para a espécie branca e K_m de 192,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}\text{min}$, V_{max} de 188,68 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e energia de ativação de 14941 cal / mol para a roxa. Esta enzima poderia desempenhar um grande papel na proteólise porque mostrou a energia de ativação menor que de outras proteinases coexistentes (26.000 ~ 28.000 cal / mol).

**Extraction and preliminary characterization of bromelain from curaua
(*Ananas erectifolius*) purple and white**

Thayse Alves de Lima e Silva^{1*}, Iara Rocha Antunes Pereira Bresolin¹, Galba Maria de Campos Takaki², Hiroshi Aoyama³, Ian Garrad⁴, and Elias Basile Tambourgi¹

¹School of Chemical Engineering, University of Campinas, UNICAMP

13083-852, Campinas, SP, Brazil

Phone: +55-19-3521-3952; Fax: +55-19-3521-3894

²Department of Chemistry, Catholic University of Pernambuco, UNICAP, Recife, PE, Brazil

³Department of Enzymology, Institute of Biological Sciences, University of Campinas, UNICAMP, 13083-862, Campinas, SP, Brazil

⁴Institute for Bioengineering, Brunel University, West London, United Kingdom

e-mail: thayse.limasilva@gmail.com

* Corresponding author

ABSTRACT

The present work reports the characterization and determination of kinetic parameters of bromelain extracted from curaua (*Ananas erectifolius*) white and purple varieties. Optimal pH and temperature conditions for proteolytic activity of curaua bromelain were determined using azocasein as substrate: (pH 4.0 – 10.0 at 5°C - 100°C). The enzyme studied has shown optimum activity at pH 6.0 for white and 6.0 and 7.0 for purple curaua, and at 40°C and 60°C for white curaua and at 40°C for the purple curaua. The lowest result of K_m and the highest result of V_{max}/K_m were found for purple curaua, but the two varieties showed affinity by the substrate azocasein, with K_m value of 185.18 $\mu\text{mol.L}^{-1}\text{min}$, V_{max} of 158.73 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ and activation energy of 13,903 for white curaua and K_m of 192.0 $\mu\text{mol.L}^{-1}\text{min}$, V_{max} of 188.68 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ and activation energy of 14,941cal/mol for purple curaua. This enzyme could to play a great role in proteolysis because it showed lower activation energy than those (26,000~28,000cal/mol) of other coexisting proteinases.

Key-words: *Ananas erectifolius*, Bromelain, Enzymatic activity, pH, Temperature, Kinetic parameters

1 INTRODUCTION

Environmental and economical concerns are stimulating research in the development of new materials for construction, furniture, packaging and automotive industries. Particularly attractive are the new materials in which a good part is based on natural renewable resources, preventing further stresses on the environment by depleting dwindling wood resources from forests. Examples of such raw material sources are annual growth native crops/plants/fibers, which are abundantly available in tropical regions. These

plants/fibers have been used for hundreds of years for many applications such as ropes, beds, bags etc. These renewable, non-timber based materials could reduce the use of traditional materials such as wood, minerals and plastics for some applications. There is a tremendous interest by the pharmaceutical industry in exploring the rain forest for new drugs, but so far there has been little interest in exploring the rain forest for fast growing native plants as a fiber source (Leao et al., 2000).

Between species in the Amazonia region with potential for production of fibers, we highlight the curaua or *Ananas erectifolius*. In Brazil and outside this plant fiber is subjected to frequent researches, which has shown significant results, which makes this species the most promising among those produced in Brazilian Amazonia (Oliveira et al., 2008).

Ananas erectifolius is a plant species belonging to the botanical family Bromeliaceae, from which few data are available in the literature. As medicinal plant, it is traditionally employed to heal wounds (Fujihashi and Barbosa, 2002).

As every plant of the Bromeliaceae family, curaua presents as constituent bromelain enzyme, that has high commercial value and wide application in the pharmaceutical, food and cosmetics industries. The bromelain is a proteolytic enzyme and belongs to the hydrolases class. Proteases are hydrolases capable of breaking the peptide bond of proteins and peptides. The broad specificity of proteases is classified according to the constitution of its active site in three main groups: serine protease, aspartic acid protease and cysteine protease, being bromelain classified in this last group (Pires and Leao, 2008).

The bromelain can find uses in various industrial and medical applications including brewing, meat tenderization, functional protein predigestion, as well as in the prevention of diarrhea, digestive aids, antithrombotic, oedema treatment and osteoarthritis and promotes

the absorption of antibiotics drugs. It also regulates and activates various immune cells and their cytokine production (Brien et al., 2004). Existing evidence indicates that bromelain can be a promising candidate for the development of future oral enzyme therapies for oncology patients (Chobotova et al., 2010).

Commercial proteolytic enzyme preparations are evaluated according to their proteolytic activity, which should be measured within the optimal conditions of enzymatic reaction. The fruit bromelain enzymatic activity can be determined with different substrates, such as casein, azocasein, haemoglobin, gelatin and some synthetic substrates, but most of these techniques have not determined enzymatic activity under the optimal conditions of pH and temperature for each substrate (Ota et al., 1964; Tisseau, 1977; Moore e Caygill, 1979; Suh et al., 1992;).

The purpose of this study was to characterize the proteolytic activity extracted from curaua white and purple species, using azocasein as substrate (pH 4.0 – 9.0 at 5 - 100°C, to obtain the best conditions of utilization this enzyme for then, a stability study to facilitate the enzymatic preparation for analytical, medical and industrial applications.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1. MATERIALS

2.1.1 Plant material

The leaves of curaua (*Ananas erectifolius*) varieties “purple” and “white” used in this study were kindly provided by the company PEMATEC, (State of Pará – Brasil). The leaves were washed and used at the bromelain extraction.

2.1.2 Chemicals

The azocasein, sodium phosphate dibasic, citric acid, and potassium phosphate was purchased from Sigma (USA). Tris(hydroxymethyl amino methane) (Tris) was purchased from Merck (Germany). Trichloroacetic acid was acquired from Synth (Brazil). Acrylamide, bis-acrylamide, sodium dodecyl sulfate (SDS), and dithiotrietol used in SDS-PAGE analysis were provided by Bio-Rad (USA). The electrophoresis calibration kit for determination of molecular mass (Phosphorylase b, 97 kDa; Albumin, 66 kDa; Ovalbumin, 45 kDa; Carbonic anhydrase, 30 kDa; Trypsin inhibitor, 20.1 kDa; α -Lactalbumin, 14.4 kDa) was purchased from GE Healthcare (USA). The water used for buffer and solution preparation was ultrapure (Milli-Q System, Millipore, USA). All other chemicals were of analytical reagent grade.

2.2 METHODS

2.2.1 Extraction and Lyophilization of Bromelain from leaves of curaua

The leaves of curaua (white and purple) were processed using a domestic juicer without water or buffer addition. For extraction of fibers, the solid material separation was performed by centrifugation at 8000 \times g for 30 min at 4°C and frozen in liquid nitrogen and lyophilized according procedure described by tha manufacture (Lioalfa 6-80 Telstar, Spain) and stored in freezer at -18°C.

2.2.2 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Protein samples were analyzed by SDS-PAGE in 15% polyacrylamide gels under denaturing and nonreducing conditions (without presence of β -mercaptoetanol) (Laemmli, 1970). These gels were subjected to a voltage, in a Mini-Protean III System (Bio-Rad, USA). The protein denaturation of samples was performed by heating at 100°C by 10

minutes. Aliquots of 15 μL of each sample and the low molecular weight marker were applied to gels. The gels were staining with silver nitrate according to Morrissey (1981).

2.2.3 Optimal pH determination

The effect of the pH on the bromelain activity from curaua was investigated with azocasein as substrate, at pH values ranging between 4.0 and 9.0 with a constant temperature of 25°C. Was used 100mM sodium phosphate (pH 4.0 – 7.0) and 100mM Tris-HCl (pH 7.0 – 9.0). The buffers used were adjusted to the desired pH to provide the specific reaction conditions for the enzyme.

2.2.4 Optimal temperature determination

The effect of the temperature on the bromelain activity from curaua was investigated with azocasein as substrate, between 5°C and 100°C.

2.2.5 Determination of kinetic parameters

The Michaelis-Menten constant, maximum reaction velocity, and the reaction specificity for azocasein were determined by plotting the activity data at optimum pH and temperature, as a function of substrate concentration according to the method of Lineweaver-Burk.

2.2.6 Analytical Methods

Bromelain activity

The protease activity was assayed by the method of azocasein (Sarath et al., 1989) by monitoring the rate of release of TCA soluble-azo-coupled peptides from azocasein at 440 nm. The reaction mixture contained 0.2 mL 2% azocasein and 0.2 mL enzyme appropriately diluted in 25 mmol L⁻¹ potassium phosphate buffer at pH 7.0. The reaction was started by the addition of the enzyme aliquot. After incubating for 10 min at 37°C, the reaction was arrested by adding 1.2 mL of 5% TCA. The test mixture was centrifuged at

6000×g for 10 min to collect the supernatant containing TCA-soluble azo-coupled peptides. The absorbance of the supernatant at 440 nm was measured against the corresponding blank run side by side in the absence of enzyme. One protease unit (U) is defined as the amount of enzyme required to hydrolyse (and TCA solubilise) one micromole of tyrosine equivalents per minute from soluble casein under standard assay conditions

Protein determination

The total protein content was analyzed by the Coomassie blue dye technique according to the procedure described by Bradford (1976). The intensity of the color was measured at 595 nm.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Estimate the molar mass of the mixture of enzymes present in the residue of curaua bromelain

We used the procedure of SDS-PAGE electrophoresis, which is a sensitive method, in which the gel is stained by silver nitrate impregnation, to determine the molar mass of bromelain curaua leaves in white and purple varieties. Figure 1 represents the results obtained from extracts of the leaves of white curaua (Fig. 1a) and purple (Fig. 1b) concentrates and diluted in two, three, four and five times in phosphate buffer. According to the electrophoresis shown in Figure 1, it appears that for both species of curaua (white and purple), proteins with molecular weight similar to the commercial bromelain were detected. The greater dilution of the extract to observe the results in electrophoresis is the two times (range 2, Figure 1a and 1b), where there is clearly a band of molecular mass of 24 kDa, as well as the marker of bromelain from the commercial pineapple.

The molar mass of commercial bromelain, found commercially in dried form, is around 24.5 kDa usually as work done by Suh et al, (1992), who purified the enzyme bromelain from the stem of the fruit and pineapple chromatography gel-filtration and determined the molar masses of 32.5 and 37 kDa respectively.

From Figure 1 we can observe several bands, however, a band near the molecular weight of 20.1 kDa is evident for white curaua.

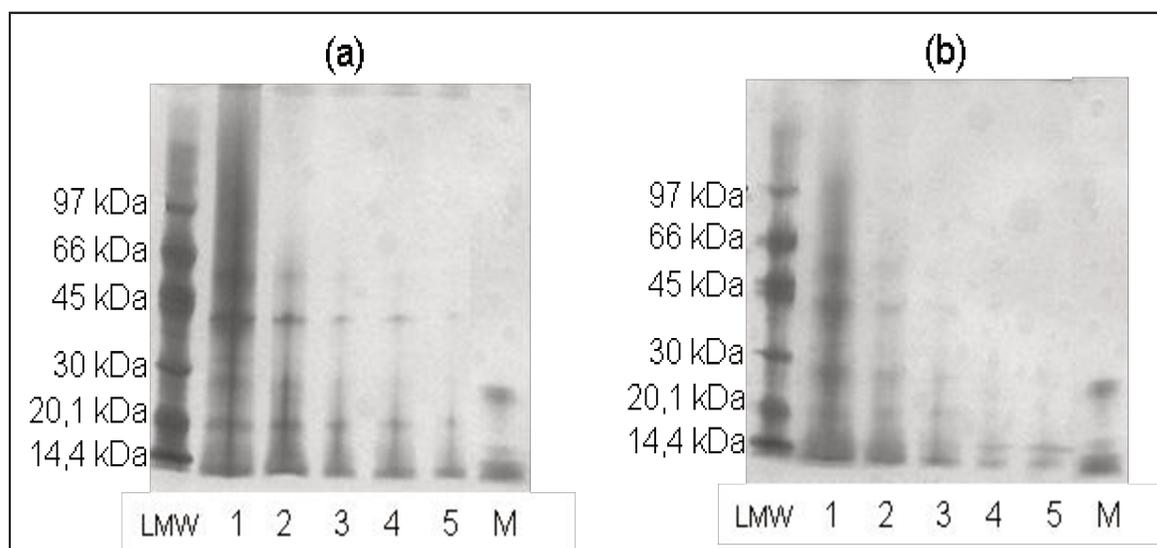


Figure 1. Electrophoretic profile of protein extracts from leaves of curaua. Samples in denaturing conditions and non-reducing. (a) polyacrylamide gel at 15% with samples of leaf extract curauá white. (b) polyacrylamide gel at 15% with samples of leaf extract curauá purple. Tracks: (LMW) marker of low molar mass: (1) crude extract, (2) two times diluted extract, (3) 3 times diluted extract, (4) four times extract diluted, (5) 5 times diluted extract; (M) marker of bromelain, bromelain performed in a solution of commercial (Fluka, USA).

As would be expected, other bands were observed in the profile of electrophoresis, because the extract curauá has a set of proteolytic enzymes, became evident the need for purification methods to make the pure enzyme. Depending on the application a higher purity is required.

Lopes et al., (2009), using SDS-PAGE electrophoresis found that the purification of bromelain from pineapple pulp (*Ananas comosus*) by ultrafiltration, the molar mass is 24.5 kDa. Murachi (1976) purified stem bromelain from pineapple by gel-filtration chromatography, and determined the molecular weight fraction pure 28 kDa by SDS-PAGE. Yamada et al. (1975) characterized the pineapple and found molecular weights of 31 and 28 kDa for the fruit and stem, respectively.

3.2 Effect of pH on the enzymatic activity of curaua bromelain

The pH is a parameter that has great influence in the maintenance of enzyme activity. The effect of this factor is due to changes in the ionization state of the system components as a result of varying the concentration of H⁺ (Ricardo and Teixeira, 1993).

The effect of pH on the enzyme activity was examined for the pH range 4.0 to 9.0. Activity was maximal at pH 6.0 for white and pH 6.0 to 7.0 for purple curaua (Figure 2).

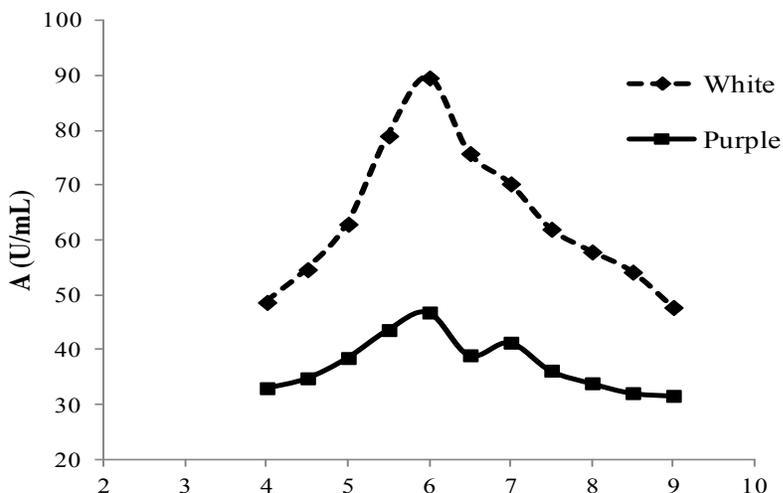


Figure 2. Effect of pH on the proteolytic activity of bromelain extracted from curaua leaves, white and purple species. Assays performed at 25°, with azocasein as substrate.

Ferreira (2011) studied the two curaua varieties and found values of optimal bromelain activity for BSA as substrate, at pH 8.5 for both, White and purple curaua; Amid

et al. (2011) studied a purified recombinant bromelain and found optimal activity for Lysine Nitrophenyl Ester as substrate, at pH 4.6. Among Bromeliaceae, peptidases exhibit a optimal pH profile with diverse behaviors: macrodontain I, extracted from fruits of *Pseudomonas macrodantes*, exhibits high activity (above 90% of maximum) over a wide range: between 6.1 and 8.5 (Lopez et al., 2000). The protease from fruits of *Bromelia hieronymi* also displayed high proteolytic activity between pH 7.5 to 10.0 (Pardo et al., 2000). Balansain I, another cysteine-protease, from unripe fruits of *Bromelia balansae* MEZ, showed a narrower and more alkaline optimum at pH 9.0 (Bruno et al., 2002). All endopeptidases extracted from pineapple (*Ananas comosus*) display a wide profile of maximum activity around neutral pH (Rowan and Buttle, 1994).

Commercial proteolytic enzyme preparations are evaluated according to their proteolytic activity, which should be measured within the optimal conditions of enzymatic reaction. Corzo et al. (2011), found optimal activity for azocasein as substrate, at 6.5 and described that there is not much research about how the optimum pH and temperature values change according to the substrate used. Azoalbumin and azocasein appear to be the most recommended substrates due to their lower K_m . This data may be very useful in future studies on bromelain stability.

3.3 Effect of temperature on the enzymatic activity of curaua bromelain

The temperature effect under tested experimental conditions showed a maximum at 40°C and 60°C for white curaua, and 40°C for purple curaua (Figure 3). Cabral et al. (2006) found a maximum activity for a cysteine peptidase at 55°C and 65°C. Amid et al. (2011) used a purified recombinant bromelain and its exhibited the highest hydrolytic activity at 45°C under routine assay conditions. The activity of recombinant bromelain was moderate

between 15°C and 35°C. The enzyme was devoid of detectable activity at 65°C. These results are comparable to the characteristics of pineapple bromelain, which is active between 40°C and 60°C.

Temperature is a critical agent on the enzyme activity. When the temperature rises, the activity increases, however, the process grows due to the denaturing action of heat (Halpern, 1997).

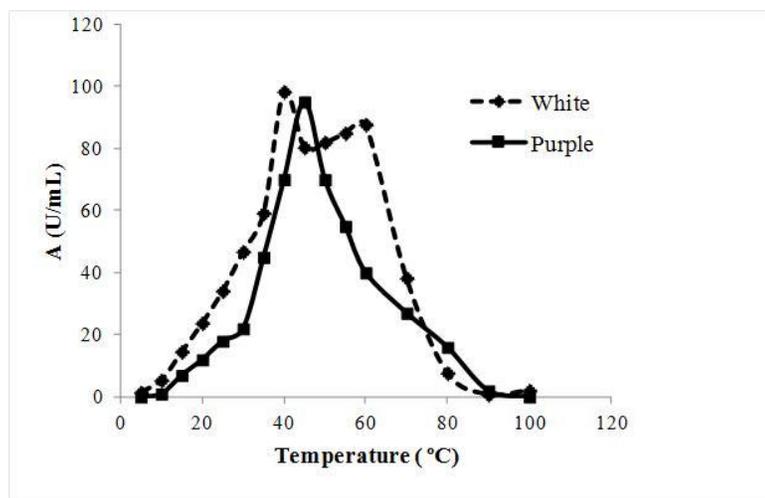


Figure 3. Effect of temperature on the proteolytic activity of bromelain extracted from curaua leaves, white and purple species. Assays performed at pH 6.0, 5°C to 100 °C, with azocasein as substrate.

The higher the temperature the greater the reaction rate until it reached the optimum temperature, above this temperature the enzyme begins to lose its function, slowing the rate of catalysis, yet it becomes idle.

Rowan et al. (1990) characterized the bromelain from pineapple stem, which showed maximal activity at 60°C. Ko et al. (1990) found an optimum temperature of 62.5°C. Khan et al. (2003) and Rasheed et al. (2003) also characterized the stem bromelain and found the optimum temperature of 37°C. Ferreira (2007) noted that the ideal temperature range for the characterization of bromelain from pineapple stem bark and is

between 30°C and 40°C, which reinforces the fact that very similar behavior between the bromelain from pineapple and curaua.

3.4 Determination of kinetic constants and Activation energy

Determination of kinetic parameters characteristics of enzymes such as kinetic constants, activation energy, temperature, pH, water activity profiles, etc, determine the usability and productivity of enzymes. For that reason, these characteristics should be determined for a newly discovered enzyme, an enzyme used in different reaction mediums or an enzyme used in different forms (such as free or immobilized). In developing an enzyme based process, kinetic constants are the most important information which has to be determined. Simple enzyme kinetics is generally described by the Michaelis-Menten kinetics (Eq. (1)), (Bailey and Ollis, 1986).

$$V = \frac{V_{max}S}{K_m + S} \quad (1)$$

where V is the enzymatic reaction rate (mmol/mn mg enzyme), S is the substrate concentration (mM), V_{max} is the maximum or limiting reaction rate (mmol/min mg enzyme) and K_m is the Michaelis-Menten constant (mM). By rearranging Eq. (1), the following equation can be derived:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{S} \quad (2)$$

Plotting of Eq. (2) as $\frac{1}{V}$ versus $\frac{1}{S}$ (known as a Lineweaver-Burk plot) gives an appropriate linear plot that is commonly used for determination of numerical values of V_{max} and K_m . Besides of Lineweaver-Burk plot, other plotting methods (Eadie-Hofstee plot, Hanes-Woolf plot) and non-linear regression methods have been also used for determination of kinetic constants (Fogler, 1999; Ozdural, et al., 2001; Boyacl, 2005).

The Michaelis-Menten constant and maximal velocity of the enzyme for the hydrolysis of whole azocasein for white and purple curaua are depicted as a Lineweaver-Burk plot (Lineweaver and Burk, 1934) in Figures 4 and 5.

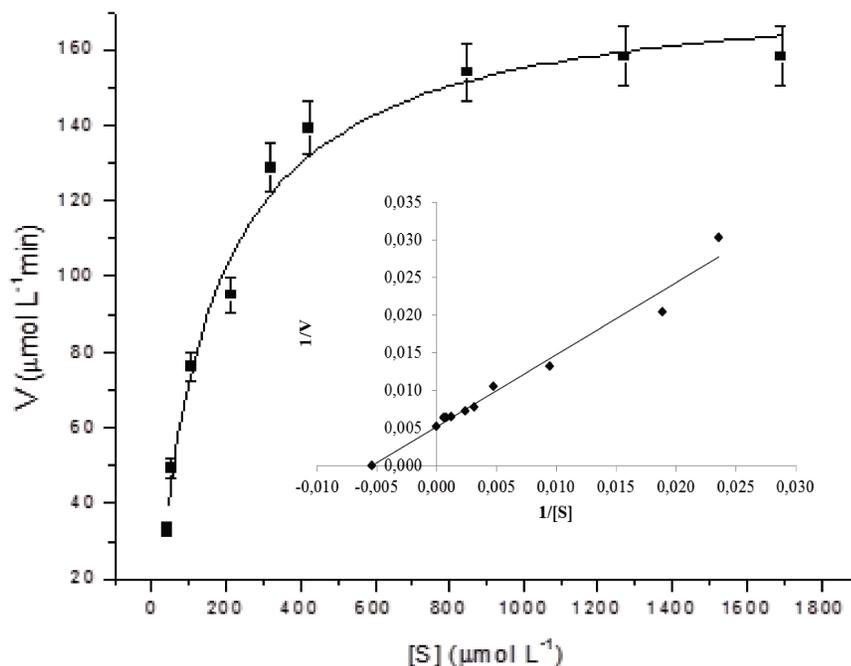


Figure 4. External Chart: Kinetics curve of hydrolysis of bromelain from the leaves of white curaua by azocaseina at pH 6.0 and 25°C. Internal Chart: Linearization of the kinetic data of hydrolysis of azocaseina to determine the constants by the method of Lineweaver-Burk – white curaua at pH 6.0 and 25° C.

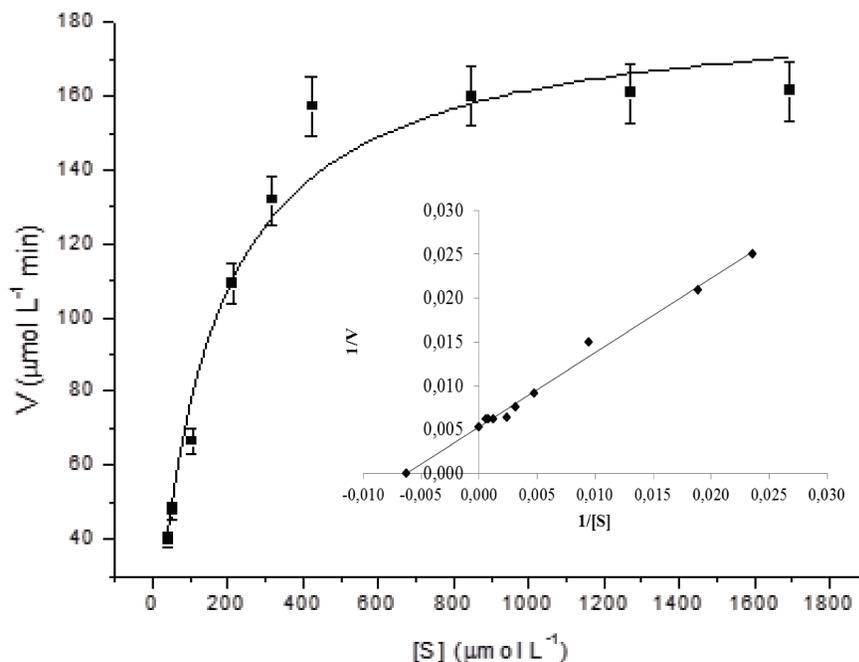


Figure 5. External Chart: Kinetics curve of hydrolysis of bromelain from the leaves of purple curaua by azocaseina at pH 6.0 and 25°C. Internal Chart: Linearization of the kinetic data of hydrolysis of azocaseina to determine the constants by the method of Lineweaver-Burk – purple curaua at pH 6.0 and 25° C.

The Michaelis-Menten constant was estimated to be 185.18 $\mu\text{mol.L}^{-1}\text{min}$, 158.73 $\mu\text{mol.L}^{-1}\text{min}$ and the maximal velocity to be 192 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, 188.68 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, for white and purple curaua, respectively (Table 1).

Ferreira (2011) find K_m values of 0,0095 $\mu\text{mol/mL}$ and V_{max} of 0,03757 $\mu\text{mol/mL.min}$, using BSA as substrate.

According to Boyacl (2005), different kinetic models or constants can be obtained from the reaction of the same enzyme. Typical examples of this situation are the V_{max} and K_m values of glucose oxidase (GO_x) enzyme determined in different studies. V_{max} and K_m values for the free form of GO_x were reported in variations of 1.0 and 66.0 $\mu\text{mol/min mg}$ enzyme and 2.9 and 30.0 mM, respectively (Tirrel and Middleman, 1978; Bulmus et al., 1997; Blandio et al., 2001).

The primary reason is that the kinetic constants were determined at different or uncontrolled reaction parameters. Generally, it is not possible to compare V_{max} and K_m values of the same enzyme when obtained from different studies. The kinetic constants depend on the reaction parameters and should be determined for each reaction parameter and the optimum reaction parameters are affected from substrate concentration not only at the extreme values, but also in the moderate concentration range (Boyacl, 2010).

V_{max}/K_m is called the enzyme catalytic power parameter and was calculated to find the most effective substrate. It was found to azocasein as substrate, 1.036 and 1.180, for white and purple curaua. This results shows that both white and purple curaua have affinity by the azocasein. Corzo Akuzawa. (2011) studied bromelain activity for different substrates and found that azocasein was the most suitable substrate for the fruit bromelain activity and highly recommended for the determination of the fruit bromelain activity at optimal reaction conditions (Table 1).

Table 1. Kinetic parameters of bromelain extracted from white and purple curaua.

Bromelain of curaua	K_m ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	V_{Max} ($\mu\text{mol.L}^{-1} \text{ min}$)	R^2	Specificity constant (V_{Max}/K_m)	Activation energy (cal/mol)
White	185.18	192.00	0.9753	1.036	13,913
Purple	158.73	188.68	0.9921	1.180	14,941

The activation energy of the enzyme (E_a) was measured for the activity against azocasein at 10°C to 60°C, pH 6.0; activation energy was estimated according to the Arrhenius formula, $\log k = \ln A - \frac{E_a}{2,3RT}$, where R = gas constant, T = absolute temperature, and k = velocity constant (Nishizawa and Shimura, 1972); the slope was

determined by the linear regression method. The activation energy was estimated to be 13,913 cal/mol and 14,941cal/mol for white and purple curaua, respectively, demonstrating that the white curaua has lower activation energy than purple curaua (Figures 6 and 7).

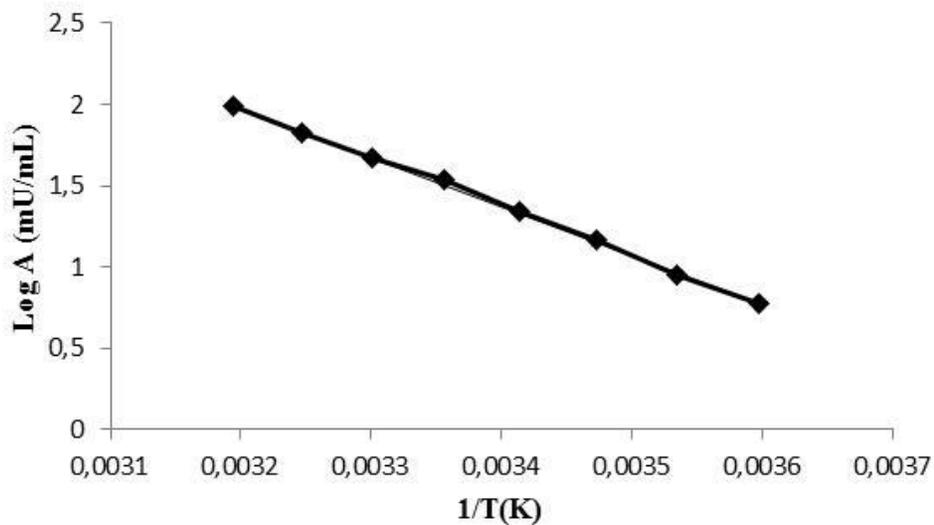


Figure 6. Determination of activation energy, through the effect of temperature on the enzymatic activity of bromelain extracted from purple curaua, based on the Arrhenius equation.

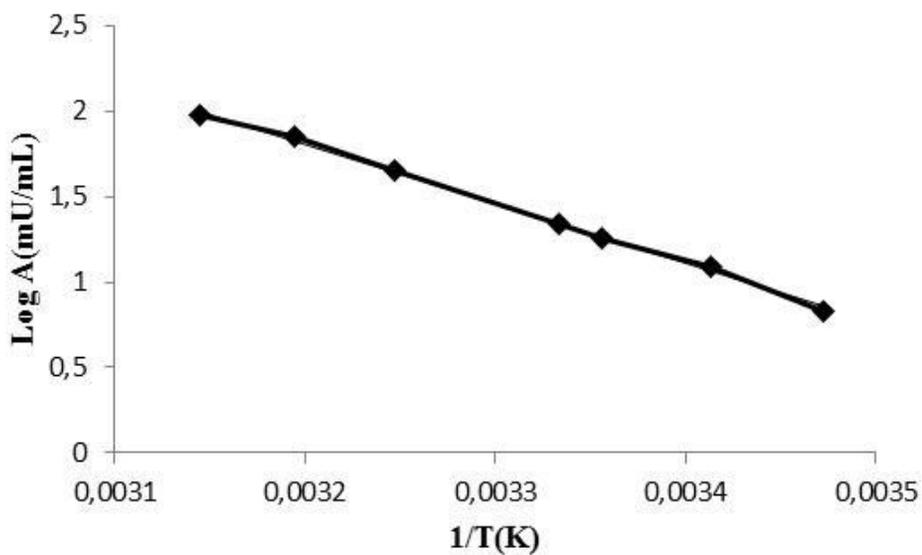


Figure 7. Determination of activation energy, through the effect of temperature on the enzymatic activity of bromelain extracted from white curaua, based on the Arrhenius equation.

The curaua bromelain showed lower activation energy than those (26,000 ~ 28,000 cal/mol) of other coexisting proteinases.

The results obtained were close to those observed by Akuzawa et al. (2010), when they studied the characterization of a cysteine proteinase from *Lactococcus lactis* and showed activation energy of 11,500cal/mol.

4 CONCLUSIONS

The leaves of curaua bromelain enzyme had its optimum activity at pH 6.0 for white and pH 6.0 to 7.0 for purple varieties, for azocasein as substrate, at 25°C. The optimal temperature was at 40 °C and 60 °C for white and 40 °C for purple curaua. The lowest value for K_m and the highest value to V_{max}/K_m were found for purple curaua, however, both varieties of curaua showed affinity by the substrate, azocasein. The use of leaves extracted from curauá by industry could be maximized by extracting not only fibers but also proteolytic enzymes of great economic importance in the pharmaceutical industry, which are discarded currently, thereby reducing the environmental impact and waste of natural resources.

5 REFERENCES

AKUZAWA, R.; OKITANI, A.; Purification and characterization of a cysteine proteinase with low activation energy from *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* IAM 1198. *Journal of Dairy Science*, v.78, p. 2609-2616, 2010.

AMID, A.; ISMAIL, N.; YUSOF, F.; SALLEH, H. Expression, purification and characterization of a recombinant stem bromelain form *Ananas comosus*. *Process Biochemistry*, v.46, p. 2232-2239, 2011.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. The kinetics of enzyme –catalyzed reactions. *Biochemical Engineering Fundamentals*, second edition, McGraw-Hill, New York, p. 86-156, 1986.

BLANDIO, A.; MACIAS, M.; CANTERO, D. Immobilization of glucose oxidase within calcium alginate gel capsules. *Process Biochemistry*, v.36, p. 601-606, 2001.

BOYACL, I. H. A new approach for determination of enzyme kinetic constants using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, v.25, p. 55-62, 2005.

BULMUS, V.; AYHAN, H.; PISKIN, E. Modified PPMA monosize microbeads for glucose oxidase immobilization. *Chemical Engineering Journal*, v.65, p. 71-76,1997.

BRADFORD, M. M.; *Analytical biochemistry*, v.72, p.248-254, 1976.

BRIEN, S.; LEWITH, G.; WALKER, A.; HICKS, S. M.; MIDDLETON, D. Bromelain as a treatment for osteoarthritis: A review of clinical studies. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 1, p. 251–257, 2004.

BRUNO, M. A.; PARDO, M. F.; CAFFINI, N. O.; LOPEZ, L. M. I. *Acta Farm. Bonaerense*, v. 21, p. 51, 2002.

CABRAL, H.; LEOPOLDINO, A. M.; TAJARA, E.H.; GREENE, L. J.; FACA, V. M.; MATEUS, R. P.; CERON, C. R.; JUDICE, W. A. S.; JULIANO, L.; GUSTAVO, O. Preliminary functional characterization, cloning and primary sequence of faustusain, a cysteine peptidase isolated from fruits of *Bromelia faustosa*, *Protein e Peptide Letters*, v. 13, p. 83-89,2006.

CHOBOTOVA, K.; VERNALLIS, A. B.; MAJID, F. A. A. Bromelain's activity and potential as an anti-cancer agent: Current evidence and perspectives. *Cancer Letters*, v. 290, p. 148–156, 2010.

CORZO, C. A.; KRZYSZTOF, N.W.; CHANES, J.W. Pineapple fruit bromelain affinity to different protein substrates. Food Chemistry, in press, May, 2011.

FERREIRA, J.F. Caracterização e purificação da enzima bromelina em sistema de duas fases aquosas PEG/Fosfato. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007. Tese (Mestrado).

FERREIRA, J.F. Extração e caracterização da enzima bromelina presente no resíduo do curauá (*Ananas erectifolius* L. SMITH). Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2011. Tese (Doutorado).

FOGLER, H. S. Nonelementary reaction kinetics. Elements of Chemical Reaction Engineering. Third edition, Prentice-Hall International, New Jersey, p. 339-425, 1999.

FUJIHASHI, G. A.; BARBOSA, W. L. R.; *Ananas erectifolius* (Curaua): Padronizacao dos extratos, fracoes e do material vegetal. Revista cientifica da UFPA, v. 3, p.1-6, 2002.

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

KHAN, R.H.; RASHEEDI, S.; HAQ, S.K. Effect of pH, temperature and alcohols on the stability of glycosylated and deglycosylated stem bromelain. Journal of Biosciences, v. 28, p. 709-714, 2003.

KO, Y.H.; KANG, Y.J. Isolation and partial characterization of proteolytic enzymes from stems of pineapples cultivated in Cheju Island Nonmunjip-Cheju Taehakkyo. Chayon Wahakpyon, v.31, p.137-142, 1990.

LAEMMLI. U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature (Lond.) v. 227 p.680, 1970.

LEAO, A. L.; CARASCHI, J. C.; TAN, I. H. Curaua fiber- A tropical natural fibers from amazon potential and applications in composites. Natural Polymers and Agrofibers Composites, Sao Carlos, Brazil, 2000.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The detennination of enzyme dissociation constants. J. Am. Chern. Soc., v.56, p.658, 1934.

LOPEZ, L.M.I.; SEQUEIROS, C.; NATALUCCI, C.L.; BRULLO, A.; BRUNO, A.; BARRA, D.; CAFFINI, N. O. Pro Exp. Purification, v.18, p. 133, 2000.

LOPES, F.L.G.; SEVERO JR, J.B.; SOUZA, R.R.; EHRHARDT, D.D.; SANTANA, J.C.C.; TAMBOURGI, E.B. Concentration by membrane separation processes of a medicinal product obtained from pineapple pulp. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 52, n. 2, p. 457-464, 2009.

MAURER, H. R. Bromelain: Biochemistry pharmacology and medical use. Cellular e Molecular Life Science, v. 58, p. 1234–1245, 2001.

MOORE, D. J.; CAYGILL, J. C. Proteolytic activity of Malaysian pineapples. Tropical Science, 21, 97–102, 1979.

MORRISSEY JH. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. Anal Biochem, v. 117, p.307-310, 1981.

MURACHI, T. Bromelain enzymes. In: Methods in Enzymology, vol. XLV. New York: Ed. L. Lorand, Academic Press, p. 475-485, 1976.

NISHIZAWA, K.; SHIMURA, K. Nyumon Kouso Kagaku. 2nd ed. Konando. Tokyo. Japan, 1972.

OLIVEIRA, E. C. P.; LAMEIRA, O. A.; SOUSA, F. I. B.; SILVA, R. J. F. Estrutura foliar de curauá em diferentes intensidades de radiação fotossinteticamente ativa. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v.43, n.2, p.163-169, 2008.

OZDURAL, A.; TANYOLAC, Z.; DEMIRCAN, I. H.; BOYACL, M.; MUTLU, C.; WEBB, A. A new method for determination of apparent kinetics parameters in recirculating packed-bed immobilized enzyme reactors. *Chemical Engineering Science*. V. 56, p. 3483-3490, 2001.

OTA, O.; MOORE, S.; STEIN, W. H. Preparation and chemical properties of purified stem and fruit bromelain. *Biochemistry*, v. 3, p. 180–184, 1964.

PARDO, M.F.; LOPEZ, L.M.I.; CANALS, F.; AVILES, F.X.; NATALUCCI, C.L.; CAFFINI, N.O. *Journal Agric. Food Chem.*, v.48, p. 3795, 2000.

PIRES, J. S. C.; LEÃO, A. L. Avaliação de princípios ativos em culturas fibrosas. In: *Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo, Anais: 16. SIICUSP*. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2008.

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

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

RICARDO, C.P.; TEIXEIRA, A. *Enzimas*. 4. ed. Lisboa: Editora Didática, 160 p. 1993.

ROWAN, A.D.; BUTTLE, D.J. IN: BARRET, A.J. *Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine peptidases*. *Methods in Enzymology*, Academic press. v.224, p. 555-568, 1990.

ROWAN, A.D.; BUTTLE, D.J., BARRETT, A.J. The cysteine proteinases of the pineapple plant. *Biochemical Journal*, v. 266, n. 3, p. 869-875, 1990.

SUH, H.J.; LEE, H.; CHO, H.Y.; YANG, H.C. Purification and characterization of bromelain isolated from pineapple, *Han'guk Nonghwa Hakhoechi*. v. 35, p. 300-307, 1992.

TIRREL, M.; MIDDLEMAN, S. Immobilization of glucose oxidase on macroreticular ion exchange resins. *Biotechnology Bioengineering*, v.20, p. 611-617, 1978.

TISSEAU, R. Activite protéolytique de l'ananas utilise en conserverie et deses déchets. *Fruits*, v. 32, p.87-92, 1977.

YAMADA, F.; TAKAHASHI, N.; MURACHI, T. Purification and characterization of a protease from pineapple fruit, fruit bromelain FA2. *Journal of Biochemistry*, v. 79, n. 6, p. 1223-1234, 1975.

CAPÍTULO III

**Estudo da atividade enzimática e estabilidade ao pH a à temperatura da
bromelina extraída do curauá (*Ananas erectifolius*) branco e**

**Manuscrito submetido à revista International Review of Chemical Engineering - Rapid
Communications (IRECHE)**

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade enzimática da bromelina extraída das folhas de curauá (*Ananas erectifolius*), branco e roxo, e estudar a estabilidade desta enzima amplamente utilizada nas indústrias farmacêutica e alimentícia. A atividade proteolítica foi medida para cada um dos testes pelo método da azocaseína. O estudo de estabilidade foi realizado pela variação das condições de armazenamento: a 4°C, -18°C e o extrato bruto liofilizado, por um período de 30 dias. Para estudar a estabilidade do pH e temperatura, as amostras foram submetidas a diferentes condições (pH 4-9) e temperaturas de (20°C-60°C) por um período de 60 minutos e, em seguida, a atividade da bromelina remanescente foi medida. Os resultados mostraram que a bromelina extraída do curauá branco liofilizado proporcionou melhor estabilidade e maior atividade enzimática durante o período de estudo, sendo mais estável a 40°C, perdendo apenas 12% da sua atividade durante os 60 minutos de incubação.

Study of enzyme activity and stability to pH and temperature of bromelain extracted from curaua (*Ananas erectifolius*) purple and white

Thayse Alves de Lima e Silva^{1*}, Iara Rocha Antunes Pereira Bresolin¹, Galba Maria de Campos Takaki², Hiroshi Aoyama³, Ian Garrad⁴, and Elias Basile Tambourgi¹

¹School of Chemical Engineering, University of Campinas, UNICAMP

13083-852, Campinas, SP, Brazil

Phone: +55-19-3521-3952; Fax: +55-19-3521-3894

²Department of Chemistry, Catholic University of Pernambuco, UNICAP, Recife, PE, Brazil

³Department of Enzymology, Institute of Biological Sciences, University of Campinas, UNICAMP, 13083-862, Campinas, SP, Brazil

⁴Institute for Bioengineering, Brunel University, West London, United Kingdom

e-mail: thayse.limasilva@gmail.com

* Corresponding author

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the activity of the enzyme bromelain extracted from the leaves of curaua (*Ananas erectifolius*), white and purple, and study the stability of this enzyme widely used in pharmaceutical and food industries. The proteolytic activity was measured for each of the tests by azocasein method. The study of stability was accomplished by varying the conditions of storage at 4°C, -18°C and the crude extract lyophilized for a period of 30 days. To study the stability to pH and temperature, the samples were subjected to different conditions for a period of 60 minutes and then the remaining bromelain activity was measured. Results showed that bromelain extracted from lyophilized curaua white provided better stability and higher enzymatic activity during the study period, and was more stable at 40°C, losing only 12% of its activity during 60 minutes of incubation.

Key-words: Curaua, Bromelain, Enzyme Activity, pH, Temperature, Stability.

1 INTRODUCTION

The use of natural raw materials has been the subject of numerous studies and research for its potential to replace petrochemical derivatives. Vegetable fibers are useful in the automotive industry, for the internal lining of cars, buses and trucks, and construction (Mothe and Araujo, 2004). Still, the serum resulting from processing leaves can serve as fertilizer orgânico. Between the species in the Amazon region with potential for production of fibers, we highlight the curaua (*Ananas erectifolius*) (Coppens and Leal, 2003; Smith, 1962).

In Brazil and abroad, curaua fiber is subjected to frequent searches, which are showing significant results, which makes this species the most promising among the

species produced in the Brazilian Amazon (Oliveira et al, 2008). Like any family plan Bromeliaceae, the curaua presented as constituting the enzyme bromelain, of high commercial value and wide application in the pharmaceutical, food and cosmetics. Bromelain is a proteolytic enzyme of the hydrolase class. The proteases are hydrolases capable of breaking the peptide bond of proteins and peptides.

The specificity of proteases is broad and classified according to the constitution of its active site into three main groups: serine protease, aspartic protease and cysteine protease, and bromelain falls in the latter group (Pires and Le, 2008). Bromelain has many uses, all based on their proteolytic activity.

Its economic importance is related to the production of drugs and their use in food industry (the manufacture of cheese, the softening of meat, the preparation of infant foods and dietary supplements, etc.) in the treatment of digestive disorders, wounds and inflammation, preparation of hydrolyzed collagens, in textile industries, for softening fibers and also in the production of detergents (Baldini et al, 1993).

A major challenge is in getting the bromelain enzyme maintain its stability during the extraction, purification, drying and storage. Therefore, studies are being conducted to identify mechanisms that lead to protein denaturation, and thus pointing ways to minimize this inactivation (Cabral, 2005). Thus, the determination of enzyme activity in plants may provide indicative curaua for further purification and thus contribute to the optimization of this kind, since the main product is the fiber extraction, and other components are currently discarded.

The objective of this study was to evaluate the stability of bromelain extracted from the white and purple curaua under different storage conditions, temperature and pH.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 MATERIALS

2.1.1 Plant material

The leaves of curaua (*Ananas erectifolius*) varieties “purple” and “white” used in this study were kindly provided by the company PEMATEC, (State of Pará – Brasil). The leaves were washed and used at the bromelain extraction.

2.1.2 Chemicals

The azocasein, sodium phosphate dibasic, citric acid, and potassium phosphate was purchased from Sigma (USA). Tris(hydroxymethyl amino methane) (Tris) was purchased from Merck (Germany). Trichloroacetic acid was acquired from Synth (Brazil). The water used for buffer and solution preparation was ultrapure (Milli-Q System, Millipore, USA). All other chemicals were of analytical reagent grade.

2.2 METHODS

2.2.1 Study of storage stability

2.2.1.1 Extraction and Lyophilization of Bromelain from leaves of curaua

The leaves of curaua (white and purple) were processed using a domestic juicer without water or buffer addition. For extraction of fibers, the solid material separation was performed by centrifugation at 8000×g for 30 min at 4°C. Part of supernatant of the crude extract was used for study of storage stability during 30 days at 4°C, -18°C (both in phosphate buffer, pH 6.0) and frozen in liquid nitrogen and lyophilized according procedure described by the manufacture (Lioalfa 6-80 Telstar, Spain) and stored in freezer at -18°C.

2.2.2 Stability to pH

The effect of pH on the enzymatic activity of the lyophilized bromelain extracted from curaua white and purple was investigated at pH values ranging between 4.0 and 9.0 with a constant temperature of 25°C.

2.2.3 Thermal stability

The thermal stability of the lyophilized bromelain extracted from curaua white and purple was investigated using multiple temperatures between 20°C and 60°C with constant pH of 6.0 for 60 minutes and then placed on ice for 5 minutes (Han; Lei,1999).

2.2.4 Analytical Methods

Bromelain activity

The protease activity was assayed by the method of azocasein (Sarath et al, 1989) by monitoring the rate of release of TCA soluble-azo-coupled peptides from azocasein at 440 nm. The reaction mixture contained 0.2 mL 2% azocasein and 0.2 mL enzyme appropriately diluted in 25 mmol L⁻¹ potassium phosphate buffer at pH 7.0. The reaction was started by the addition of the enzyme aliquot. After incubating for 10 min at 37°C, the reaction was arrested by adding 1.2 mL of 5% TCA. The test mixture was centrifuged at 6000×g for 10 min to collect the supernatant containing TCA-soluble azo-coupled peptides. The absorbance of the supernatant at 440 nm was measured against the corresponding blank run side by side in the absence of enzyme. One protease unit (U) is defined as the amount of enzyme required to hydrolyse (and TCA solubilise) one micromole of tyrosine equivalents per minute from soluble casein under standard assay conditions

Protein determination

The total protein content was analyzed by the Coomassie blue dye technique according to the procedure described by Bradford (1976). The intensity of the color was measured at 595 nm.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Study of storage stability

The temperature of storage of an enzyme is an extremely important factor for maintaining its catalytic activity, since the heat is a denaturing agent (França-Santos et al, 2009).

Besides the normal denaturation that all protein suffers over time, the reason the enzymes retain their activity, is the fact that a protease acting on the other will. In a cold environment, reduces the reaction rate and the enzymes present active longer.

According to the results obtained in Figures 1 and 2 it was observed that the enzymatic activity of bromelain curaua the white and purple had become more stable when stored after freeze-drying, where the white curaua lost about 5% of its activity and purple around 15% over the 30 days.

The samples stored at -18° C lost 56.4% and 51.1% of activity for the curaua white and purple, respectively, while both samples stored at 4° C lost approximately 91% of their activities.

Amid et al (2011) the authors compared the loss of enzyme activity at 4° C for 7 days at a recombinant bromelain and bromelain commercially available, finding values of 27.5% and 4.7%, respectively. Interpolating the results obtained in this work for storage at

4° C for 7 days, there was a loss of activity of 55.6% and 45.1% for curaua white and purple respectively.

The loss of activity shown in these results was greater than that of Amid et al, (2011), but this can be explained by the different source of bromelain used, unpurified extract from the leaves of curaua.

The enzyme activity in curaua leaves shows significantly lower activity than in the fruit, but the sheer volume of mucilage removed to obtain the fibers is dispensed by the industry, which can enable economically the extraction of bromelain from this source, providing indications for further purification and application.

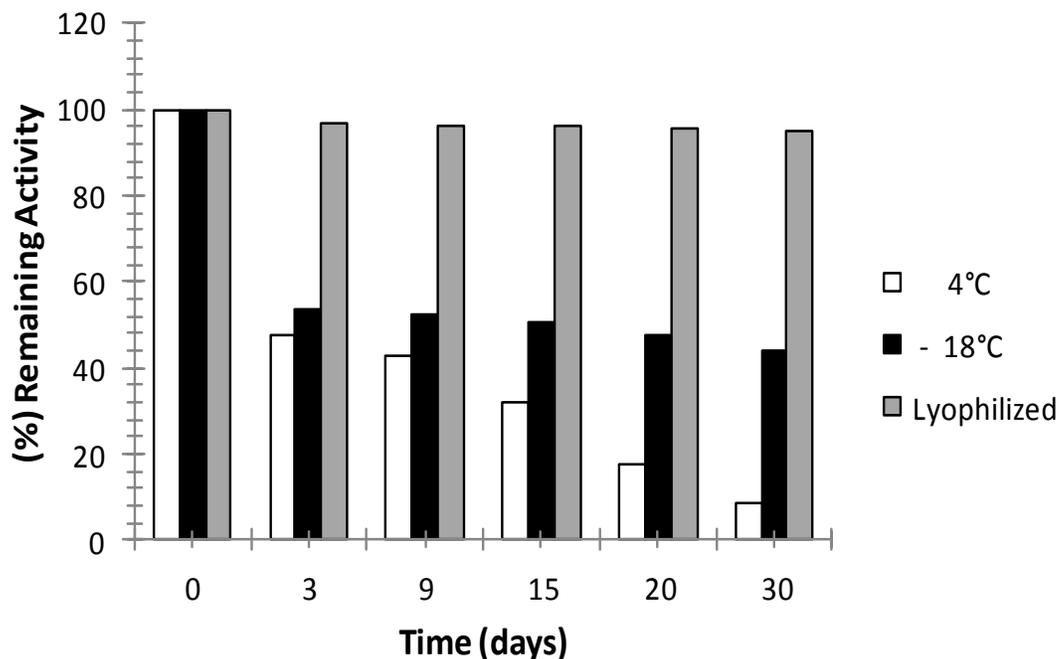


Figure 1. Stability of the activity of bromelain extracted from curaua (white) during 30 days of incubation, pH 6.0, at a temperature of 5°C (refrigerator), -18°C (freezer) and lyophilized crude extract.

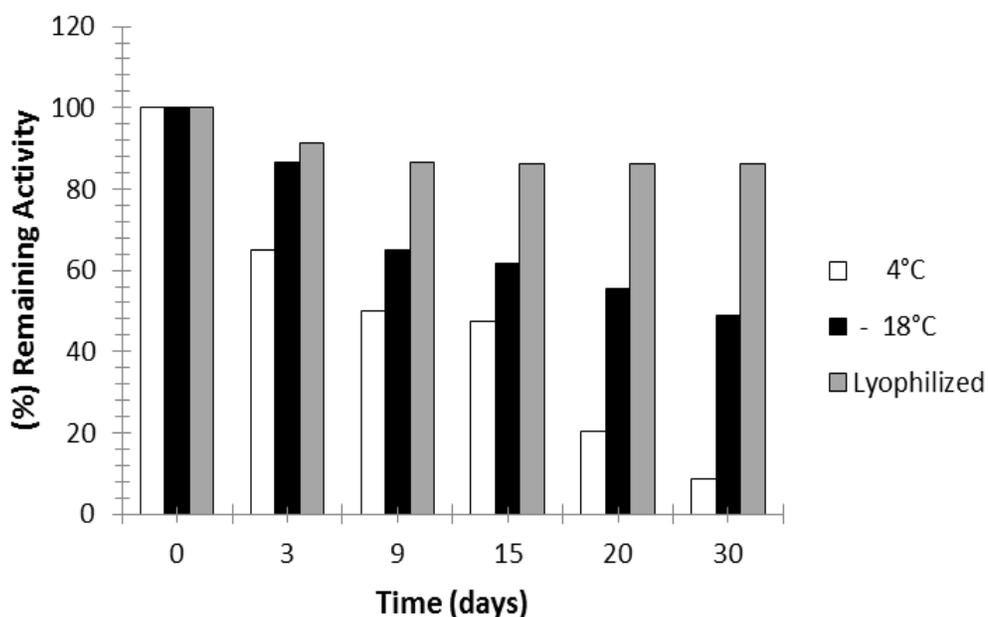


Figure 2. Stability of the activity of bromelain extracted from curaua (purple) during 30 days of incubation, pH 6.0, at a temperature of 5°C (refrigerator), -18°C (freezer) and lyophilized crude extract.

3.2 Stability to pH

Enzymes have an optimum pH and temperature, and the optimal load distribution for catalysis; outside these optimum values, the enzyme activity decreases, since the enzyme begins to lose its function to become inactive.

These data are extremely important in the strategy of purification of bromelain and its industrial application, avoiding the loss of activity by using pH ranges of temperatures and aggressive enzymes and reduced efficiency of the method employed (Santana, 2006).

In 2006, Silva et al found that the enzyme was most stable between 25° and 40°C and between a pH of 5.5 and 8.0. Later however, they studied the stability of the enzyme from purple curaua under different storage conditions (Silva, 2011) and concluded that bromelain from this source showed best activity and stability at pH 8.0 when kept at 10°C but at pH 4.0 when kept at 25°C. These results are slightly different from those of Harrach et al (1998) who studied the characterization of bromelain from *Ananas cosmosus*. This group found pH 7.5 to be the optimum for stability, regardless of temperature.

In this research project, The enzyme solutions curaua of both the white and purple curaua showed greater stability for pH 7.0 and 6.0, respectively, which are also the values of pH optimum of the enzyme (Figs 3 and 4). Curaua bromelain presents a significant variation of enzyme activity with pH change, showing a clear maximum stability at pH 7.0 and 6.0 for substrate azocasein.

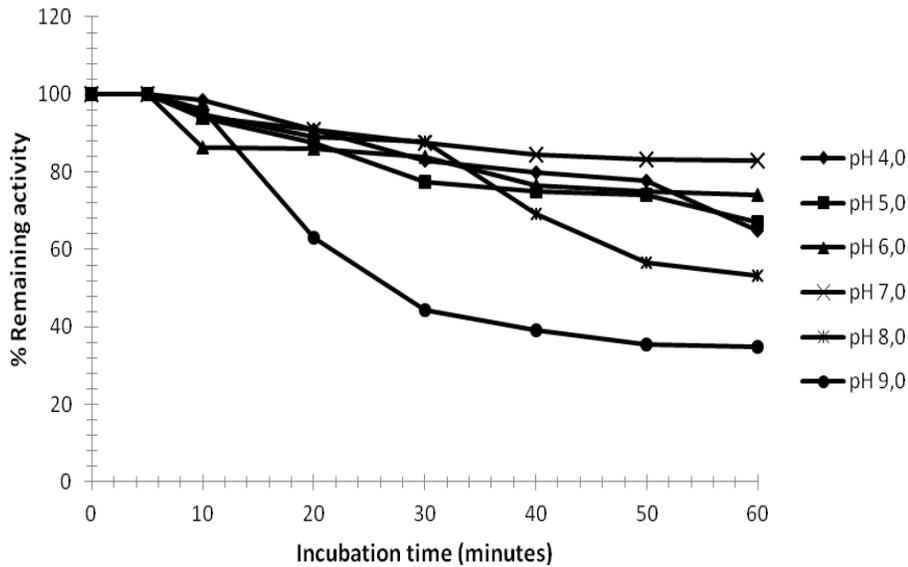


Figure 3. Stability of the enzymatic activity of bromelain extracted from curaua (white), during 60 minutes, at different pH values.

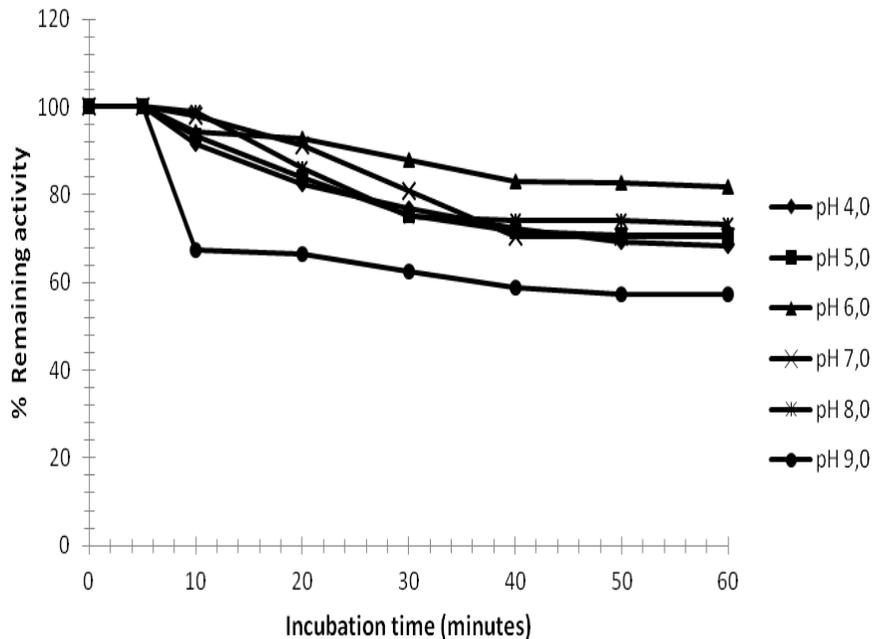


Figure 4. Stability of the enzymatic activity of bromelain extracted from curaua (purple), during 60 minutes, at different pH values.

3.3 Thermal stability

Stability is an important parameter, which co-determines the economic feasibility of applying an enzyme in an industrial process. High stability is generally considered an economic advantage because of reduced turnover. In addition, stable enzymes permit the use of high process temperatures, which may have beneficial effects on reaction rates, reactant solubility and the risk of microbial contamination. Enzymes are increasingly used in feed where they may need to withstand hygienic heat treatments and harsh processes such as extrusion (Eijsink et al, 2004).

Figures 5 and 6 show the effect of the thermal stability of bromelain curaua white and purple. As we can see, bromelain has lost the white curaua 5% and 20% of catalytic activity at temperatures of 20°C and 30°C respectively during the 60 minutes of incubation. Already at 40°C, 50°C and 60°C, the loss of activity after 60 minutes was 44%, 68% and 80% respectively.

Bromelain of the purple curaua lost 21% of its catalytic activity after 60 minutes of incubation at 20°C, and 44% and 88% at 30°C, 40°C, respectively. When the temperature reached 50° C, the loss of activity was 97% and 60°C, it loses its activity rapidly, and with 40 minutes of incubation lost 100% of its catalytic activity.

Amid et al (2011) studied the thermal stability of a recombinant bromelain and compared with the business, achieving greater stability for both enzymes at temperatures of 30°C, 45°C and 60°C.

Since the beginning of large scale enzyme production for industrial applications, protein engineering methods have been applied to improve enzyme properties. The best-known example is the work on subtilisin (Bryan, 2000) and closely related proteases, which are widely used in detergents.

Studies on the stability of small enzymes which unfold reversibly at high temperatures have permitted thermodynamic assessment of certain types of interactions for protein stability (Matthews, 1993).

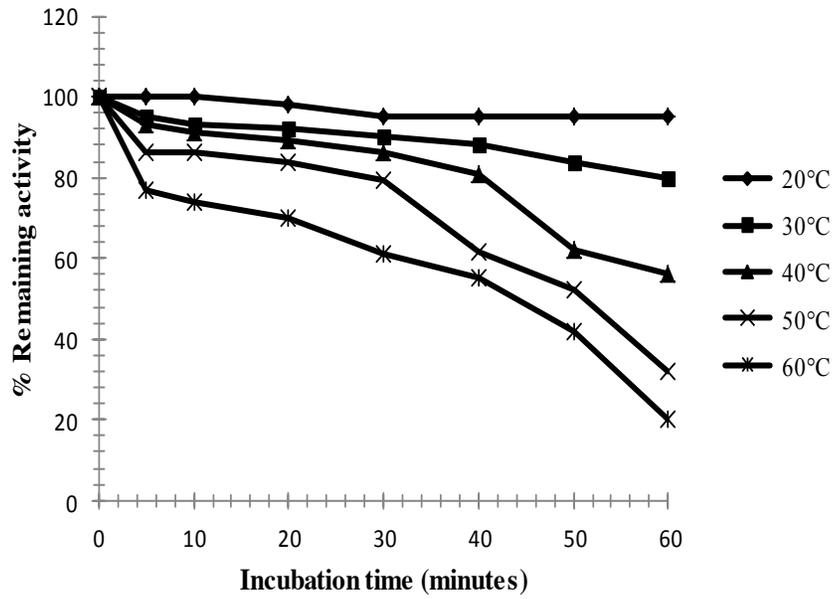


Figure 5. Stability of the enzymatic activity of bromelain extracted from curaua (white), during 60 minutes, at different temperatures values.

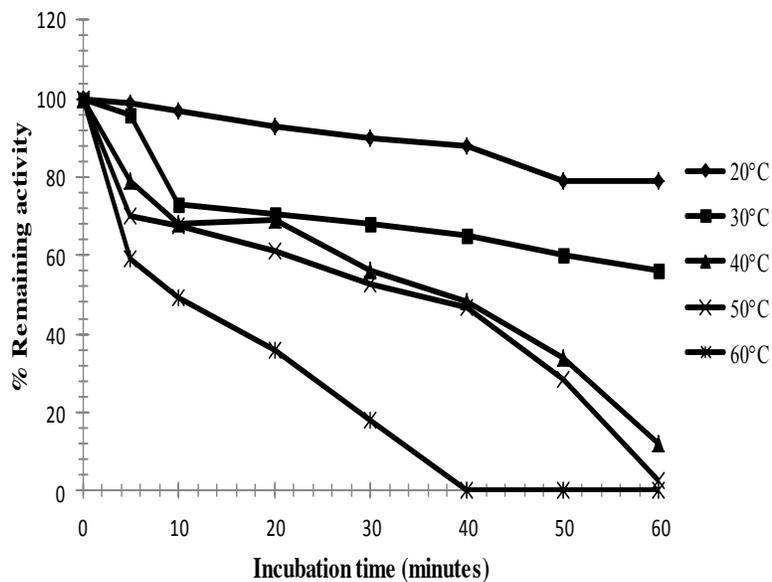


Figure 6. Stability of the enzymatic activity of bromelain extracted from curaua (purple), during 60 minutes, at different temperatures values.

4 CONCLUSIONS

Bromelain curaua of two varieties showed good stability when stored lyophilized, and the white curaua sample showed higher values of enzyme activity.

The best profile of the pH stability of bromelain was observed for purple curaua, which remained stable at pH 6.0. For white curaua, the enzyme was most stable at pH 7.0. The white curaua presented more thermally stable, and both, (white and purple) showed better stability at 20°C.

Simple methods can provide many useful strategies to give some new features related to protein stability and catalytic activity.

The use of curaua by the industry can be maximized, drawing not only the plant fibers, proteolytic enzymes but also of high economic value, thereby reducing the environmental impact and waste.

After this study it was concluded that Bromelain can be prepared previously to its use, remained relatively stable for a period as long as stored under proper conditions of pH and temperature which do not promote denaturation (including by protease autodigestion).

5 REFERENCES

AMID, A.; ISMAIL, N.A.; YUSOF, F.; SALLEH, H.M. Expression, purification and characterization of a recombinant stem bromelain from *Ananas comosus*. *Process Biochemistry*, v.46, p. 2232-2239, 2011.

BALDINI, V.L.; IADEROSA, M.; FERREIRA, E.A.; SALES, A.M.; DRAETTA, I.S.; GIACOMELLI, E.J. Ocorrência da bromelina em espécies e cultivares de abacaxizeiro. *Colet. ITAL, Campinas*, v. 23, p. 44-55, 1993.

BRADFORD, M. M.; *Analytical biochemistry*, 72, 248-254, 1976.

BRYAN, P. N. Protein engineering of subtilisin. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1543, p. 203-222, 2000.

CABRAL, A. C. S. Otimização de parâmetros para secagem de enzimas por spray dryer. Tese de Mestrado. Universidade de São Paulo/ Ribeirão Preto-Ciências Farmacêuticas, 97p. 2005.

COPPENS D'EECKENBRUGGE, G. E LEAL, F. Morphology, Anatomy and Taxonomy. In: Bartholomew, D.P., Paull, R.E. and Rohrbach, K.G. (eds.): *The Pineapple: Botany, Production and Uses*, CAB International, Wallingford (Great Britain), cap. 2, p.13-32, 2003.

EIJSINK, V.G.H.; BJORK, A.; GASEIDNES, S.; SIREVAG, R.; SYNSTAD, B.; BURG, B.V.D.; VRIEND, G. Rational engineering of enzyme stability. *Journal of Biothecnology*, v.113 p.105-120, 2004.

FRANÇA-SANTOS, A.; ALVES, R. S.; LEITE, N. S.; FERNANDES, R. P. M., Estudos bioquímicos da enzima bromelina do *Ananas cosmosus* (abacaxi). *Scientia Plena*, v.5, n.11, p.1-6, 2009.

HAN, Y.M.; LEI, X.G. Role of glycosylation in the functional expression of an *Aspergillus niger* phytase gene (phyA) in *Pichia pastoris*. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 364, p. 83-90,1999.

HARRACH, T.; ECKERT, K.; MAURER, H. R. Isolation and characterization of two forms of an acidic bromelain stem proteinase. *J. Prot. Chem.*, v.17, p. 350-361, 1998.

MATTHEWS, B.W. Studies on protein stability with T4 lysozyme. *Adv. Prot. Chem.* v. 46, p. 249-278,1993.

MOTHE, C. G.; ARAUJO, C. R. Thermal and mechanical characterization of polyurethane composites with curaua fibers. *Polímeros*, v.14, p.274-278, 2004.

OLIVEIRA, E. C. P.; LAMEIRA, O. A.; SOUSA, F. I. B.; SILVA, R. J. F. Estrutura foliar de curauá em diferentes intensidades de radiação fotossinteticamente ativa. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v.43, n.2, p.163-169, 2008.

PIRES, J. S. C.; LEÃO, A. L. Avaliação de princípios ativos em culturas fibrosas. In: *Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo*, 16, São Paulo. Anais: 16 SIICUSP, 2008.

SANTANA J. C. C. Caracterização e recuperação das enzimas α e β - amilases por sistema de adsorção em leito expandido. Tese de doutorado, UNICAMP, 2006.

SARATH G, De La M.R.S.; WAGNER F.W. Protease assay methods. In: Beynon RJ, Bonde JS. *Proteolytic enzymes: a practical approach*. Oxford: Oxford University Press, p.25-54, 1989.

SILVA, T.A.L.; TAMBOURGI, E.B. Estudo da estabilidade da enzima bromelina extraída do curauá roxo (*Ananas erectifolius*). *Scientia Plena*, v.7, n.1, p.1-5, 2011.

SILVA, R. A.; CADENA, P. G.; LIMA FILHO, J. L.; PIMENTEL, M. C. B. O fármaco bromelina: estudos físico-químicos e cinéticos. In: *Congresso Brasileiro de Química*, 46, 2006, Salvador, Bahia. Anais: XLVI Congresso Brasileiro de Química, Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Química, Resumo 292, 2006.

SMITH, L. B. A new look at the species of pineapple. *Bromeliad Society Bulletin*, v. 12, p. 54-55, 1962.

CAPÍTULO IV
CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

A enzima bromelina das folhas do curauá teve sua atividade ótima em pH 6,0 para a espécie branca e pH 6,0-7,0 para a roxa, utilizando azocaseína como substrato, a 25°C. A temperatura ótima foi de 40°C e 60°C para a branca e 40°C para a roxa.

O menor valor para k_m e o maior valor para a constante de especificidade foi encontrado com a espécie roxa, no entanto, ambas as variedades de curauá mostraram afinidade pelo substrato, azocaseína. Sendo a espécie branca a que apresentou a menor energia de ativação, sendo mais eficiente que a roxa.

A bromelina do curauá branco e roxo mostrou boa estabilidade quando armazenado liofilizado, e a amostra do curauá branco apresentou valores mais elevados de atividade enzimática. O melhor perfil de estabilidade do pH da bromelina foi observado para o curauá roxo, que permaneceu estável em pH 6,0. Para o branco, a enzima foi mais estável em pH 7,0. As bromelinas do curauá branco e roxo se apresentaram mais estáveis termicamente, a 20 ° C. A Bromelina se mantém relativamente estável por 30 dias, desde que armazenada em condições adequadas de pH e temperatura que não promovam a sua desnaturação (incluindo por autodigestão protease).

O uso de folhas extraídas de curauá pela indústria pode ser maximizada através da extração não apenas de fibras mas também de enzimas proteolíticas de grande importância econômica na indústria farmacêutica, que atualmente são descartadas, reduzindo o impacto ambiental e desperdício de recursos naturais.

CAPÍTULO V

ADENDO

ADENDO

Durante o decorrer deste trabalho auxiliamos em outras pesquisas e seus resultados foram submetidos para publicação e apresentados em congressos:

SILVA, T. A. L. ; TAMBOURGI, E.B. Estudo da Estabilidade da Enzima Bromelina Extraída do Curaua roxo (*Ananas erectifolius*). Scientia Plena, v. 7, p. 1-5, 2011.

SILVA, T. A. L. ; Ferreira, J.F. ; MARQUES, P.P. ; BRESOLIN, I.R.A.P.; TAMBOURGI, E.B. . Estudo da Estabilidade Enzimática da Bromelina Extraída do Curauá (*Ananas erectifolius*) sob Diferentes Condições de Armazenamento. In: XVIII SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS - SINAFERM, 2011, Caxias do Sul. XVIII SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS - SINAFERM, 2011.

LIMA E SILVA, T.A. ; TAMBOURGI, E.B. ; FERREIRA, J.F. . Estudo da estabilidade da enzima bromelina extraída do curauá (*Ananas erectifolius*). In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2010, Foz do Iguaçu. Congresso Brasileiro de Engenharia Química - 2010, 2010.

LIMA E SILVA, T.A. ; TAMBOURGI, E.B. ; CAMPOS-TAKAKI, G. M. . ESTABILIDADE AO pH E À TEMPERATURA DE BROMELINA EXTRAÍDA DAS FOLHAS DO CURAUÁ (*Ananas erectifolius*). In: IX Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2010, Rio de Janeiro. IX Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2010.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O estudo da estabilidade enzimática da Bromelina do curauá mostrou-se analiticamente viável e de grande importância prática, pois trata-se de um material atualmente descartado pela indústria automobilística e de grande importância para a indústria farmacêutica.

Propõe-se como sugestão para novos trabalhos, um estudo de estabilidade da bromelina extraída do curauá após um método rápido e de baixo custo para purificação, em conjunto com o estudo da comparação da estabilidade enzimática da bromelina do curauá branco e roxo, após diferentes métodos de extração e antes e depois da purificação.