

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

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

**ESTUDO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA BROMELINA PURA EM SOLUÇÃO  
EM DIFERENTES TEMPERATURAS E pH**

Autora: Patrícia Helena de Godoi  
Orientador: Prof.Dr. Elias Basile Tambourgi

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

Campinas – 2007

UNIDADE BC

Nº CHAMADA:

T/UNICAMP G547e

V. \_\_\_\_\_ EX. \_\_\_\_\_

TOMBO BCCL 75716

PROC 16P-129-03

C \_\_\_\_\_ D X

PREÇO 11,00

DATA 20-02-03

BIB-ID 424214

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

G547e Godoi, Patrícia Helena de  
Estudo da atividade enzimática da bromelina pura em  
solução em diferentes temperaturas e pH / Patrícia Helena  
de Godoi.--Campinas, SP: [s.n.], 2007.

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

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

Título em Inglês: Bromelain enzymatic activity in solutions at different temperatures and pH

Palavras-chave em Inglês: Bromelain, Enzymes purification, Enzymes denaturation

Área de concentração: Sistemas de Processos Químicos e Informática

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Jabra Haber e Sergio Ricardo Lourenço

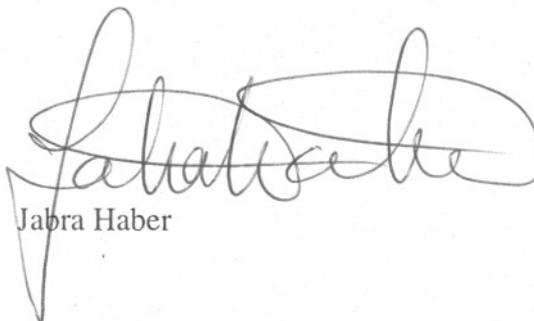
Data da defesa: 28/03/2007

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado , defendida por Patrícia Helena de Godói em 28 de março de 2007 e aprovada pela banca constituída pelos seguintes doutores:



Sérgio Ricardo Lourenço



Jabra Haber



Elias Basile Tambourgi

200802482

Prof dr Elias Basile Tambourgi-orientador



Esta versão corresponde à final da Dissertação de Mestrado defendida por Patrícia Helena de Godoi

AGRADE

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus queridos pais Adilson e Arlete, pelo incentivo ao estudo durante toda minha vida, pela dedicação, exemplo de luta, esforço e amor incondicional.

Às minhas queridas irmãs Daniela e Stela pelo exemplo, preocupação, ensinamentos e amizade. Vocês moram em meu coração.

Ao meu amor Jonas, sempre presente, doce e compreensivo, inclusive com minhas ausências, por ter acreditado em meu trabalho.

Às fiéis Teca, Mila e Vitória pelo amor puro e companhia nas horas mais difíceis.

À amiga Flávia (que muito me incentivou), às amigas Rosemeire e Regina, pelas horas maravilhosas que passamos juntas durante estes anos e pela amizade que torna minha vida mais leve e alegre.

Ao Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi pela oportunidade, confiança, orientação e amizade.

Aos colegas Gilvan, Heloísa e Paulo Mattos pelas valiosas informações.

Aos amigos, Débora, Richard, Sr. Jorge pelo carinho de vocês.

A Deus por ter me dado esta oportunidade.

Aos funcionários da FEQ e a todos que de alguma maneira contribuíram para realização deste trabalho.

“O segredo é não correr atrás das borboletas...  
É cuidar do jardim para que elas venham até você”

Mário Quintana

## ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
NOMENCLATURA.....	x
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. Proteínas.....	3
2.1.1. Enzimas.....	4
2.1.2. Desnaturação.....	5
2.1.3. Bromelina.....	7
2.1.4. Proteases.....	10
2.2. Abacaxi.....	11
2.2.1. Fruticultura brasileira.....	11
2.2.2. Cultivo e cultura.....	13
2.2.3. Composição Química.....	15
2.2.4. Processamento da Fruta.....	16
2.2.5. Produtos e sub-produtos do processamento.....	16
2.3. Aplicações de enzimas.....	18
2.3.1. Aplicações de enzimas em medicamentos e em análises clínicas.....	20
2.3.2. Aplicações da bromelina.....	22
2.4. Atividade enzimática.....	24
2.4.1. Método Espectrofotométrico.....	24
3. Materiais e Métodos.....	28
3.1. Preparo das amostras.....	28
3.2. Dados experimentais.....	28
3.3. Determinação da atividade enzimática.....	30
3.3.1. Curva de calibração.....	30
3.3.2. Atividade enzimática da bromelina.....	30
4. Resultados e discussão.....	30
4.1. Apresentação dos resultados obtidos.....	30
4.2. Curva de calibração.....	32

4.3. Atividade enzimática da solução de bromelina p.a em função do tempo para diferentes valores de pH.....	33
4.4. Atividade enzimática da bromelina da polpa do abacaxi Pérola em função do tempo para diferentes valores de pH.....	35
4.5. Atividade enzimática da bromelina p.a. em solução em função da temperatura.....	37
5. Conclusões.....	39
6. Sugestões para trabalhos futuros.....	41
7. Referências Bibliográficas.....	42
ANEXOS.....	46
APÊNDICE A.....	48
Descrição do método para a determinação da atividade proteolítica através da hidrólise da caseína.....	48

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Produção de Frutas, Brasil – 1994/1995 e 2004/2005 (1000 toneladas).

Tabela 2 - Produção mundial de abacaxi em 2005.

Tabela 3 - Variáveis estudadas para Bromelina P.A em solução.

Tabela 4 - Variáveis estudadas para Bromelina polpa do abacaxi Pérola.

Tabela 5 - Resultados de atividade enzimática obtidos para Bromelina P.A.

Tabela 6 - Resultados de atividade enzimática obtidos para Bromelina presente na polpa do abacaxi Pérola.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 4.2.1 - Curva de calibração tirosina para determinação da atividade enzimática da bromelina.

Figura 4.3.1 - Atividade enzimática da bromelina p.a. em solução aquosa 0,2% (m/v) armazenada em geladeira ( $T = 2^{\circ} C$ ) em função do tempo.

Figura 4.3.2 - Atividade enzimática restante da bromelina p.a. em solução aquosa 0,2% (m/v) armazenada em geladeira ( $T = 2^{\circ} C$ ) em função do tempo.

Figura 4.4.1 - Atividade enzimática da bromelina presente na polpa do abacaxi Pérola armazenada em geladeira ( $T = 2^{\circ} C$ ) em função do tempo.

Figura 4.4.2 - Atividade enzimática restante da bromelina presente na polpa do abacaxi Pérola armazenada em geladeira ( $T = 2^{\circ} C$ ) em função do tempo.

Figura 4.5.1 - Atividade enzimática da solução de bromelina p.a. em pH 4 e 8 em função da temperatura.

Figura 4.5.2 - Atividade enzimática restante da bromelina p.a. em solução em função da temperatura.

## NOMENCLATURA

a: absortividade

A: Absorbância

b: distância que a luz atravessa

c: concentração

$f_N$ : fração de proteína nativa

g/L: grama/Litro

g/mL: grama/mililitro

I: intensidade da luz incidente

$I_o$ : intensidade da luz que conseguiu atravessar a amostra

mM: miliMol

m/v : massa/volume

PEG: Polietileno Glicol

T: Transmitância

TCA: Ácido Tricloroacético

U: Unidade de Atividade Enzimática

v/v: volume/volume

## RESUMO

Bromelina é uma enzima de origem vegetal obtida de diversas espécies da família *Bromeliaceae*, presente na casca, no talo e no fruto do abacaxi. O Brasil encontra-se entre um dos maiores produtores mundiais de abacaxi, ocupando o terceiro lugar no ranking mundial. O desenvolvimento de novas técnicas de extração e purificação da bromelina vem sendo bem explorado, entretanto, tornou-se necessário um estudo de estabilidade desta protease, proporção pela qual a bromelina conserva sua conformação estrutural ou sua atividade quando sujeita à estocagem, isolamento e purificação ou várias outras manipulações físicas ou químicas, incluindo autodigestão, outras enzimas proteolíticas e aquecimento.

Tornou-se de fundamental importância saber em que condições a bromelina se mantém estável, ou seja, ativa e por qual período de tempo, já que a meta mais significativa da enzimologia aplicada é obter compostos úteis para biocatálise. Este trabalho apresenta um estudo das condições de pH e temperatura nas quais a Bromelina P.A em solução aquosa em concentração próxima ao do suco extraído da polpa da fruta, mantém-se ativa, ou seja, não desnaturada. A atividade enzimática da bromelina em solução foi medida através da hidrólise da caseína e a condição de pH e temperatura mais próxima da ideal foi determinada.

Palavras Chave: Bromelina, Atividade Enzimática, Estabilidade.

## **ABSTRACT**

Bromelain is a vegetable enzyme found in many species of *Bromeliaceae* family, its present in pineapple skins, stem and fruit. Brazil is one of the world's largest producers of pineapples, its production being the third one in the world. The development of new extraction and purification processes of bromelain have been studied, however, its necessary a enzyme stabilization investigation, state that bromelain remains its structure or biological activity when stored, isolated, purified or any other manipulation, included autodigestion, proteolytic enzymes and heating.

It became very important to know the conditions and the time which bromelain remain stabilized, active. In applied enzymology, the most significant goal is to achieve useful compounds by biocatalysis. This work presents a study about pH and temperature conditions which a bromelain aqueous solution, in the same concentration of a pineapple fruit extract, remains with biological activity. The bromelain aqueous solution enzyme activity was tested across the casein hydrolysis and the ideal pH and temperature was determinated.

Key-words: Bromelain, Enzyme Activity, Stability.

## 1. Introdução

O uso de enzimas em aplicações industriais, medicamentos e análises clínicas é uma tendência em todo o mundo. As enzimas são utilizadas como biocatalizadores em química orgânica como uma alternativa aos processos químicos clássicos por apresentarem inúmeras vantagens. Dentre estas se destacam elevada velocidade de reação; utilização de condições brandas; compatibilidade com substratos sintéticos; em alguns casos podem catalisar as reações nos dois sentidos e podem, ainda, apresentar alguma seletividade quanto ao tipo de reação que catalisam. Já em medicamentos, a grande eficiência das enzimas aliada à sua especificidade, tornam-nas, a princípio, agentes de grande potencial para uso terapêutico. Entretanto, deve-se levar em conta os aspectos como especificidade, pH ótimo, temperatura de estabilidade, presença de ativadores ou inibidores, preço e viabilidade. Para aplicações terapêuticas, principalmente para uso interno, a enzima precisa ter um elenco de características apropriadas tais como: alta atividade e estabilidade em pH fisiológico, baixa resposta imunológica e alta afinidade pelo substrato.

Bromelina é o nome genérico dado às enzimas proteolíticas encontradas no abacaxi, bem como em outras espécies da família *Bromeliaceae*. Conforme será discutido na revisão bibliográfica que se segue, esta enzima presente no abacaxi mostrou-se um objeto de análise relevante e viável ao estudo da estabilidade enzimática, já que, segundo BALDINI et. al. (1993), o abacaxi é o único fruto que possui concentrações relativamente altas no estado maduro, embora ligeiramente decrescentes. Estudiosos deste tema têm revelado que a enzima não está presente nos primeiros estágios de desenvolvimento do fruto, entretanto, seu nível aumenta rapidamente, mantendo-se elevado até o amadurecimento, diferente do que ocorre, por exemplo, com a proteína presente no mamão, a papaína, a qual somente é encontrada em altos níveis quando o fruto ainda está verde.

Várias são as aplicações da bromelina. No segmento de análises clínicas, por exemplo, é utilizada em solução aquosa no pré-tratamento de amostras de sangue a serem tipadas para o grupo ABO/Rh. A solução de enzima em contato com a superfície das hemácias propicia a retirada das proteínas de superfície, expondo os antígenos eritrocitários, que responderão melhor ao teste analítico de tipagem. Como já afirmado a respeito das enzimas em geral, a bromelina também possui grande atividade terapêutica. Devido a sua propriedade antiinflamatória, ajuda na recuperação de pequenos ferimentos, particularmente de entorses e estiramentos, lesões musculares e dor, inchaço e sensibilidade que acompanham danos causados pela prática de esportes. Os efeitos proteolíticos do uso oral de bromelina combinada a outras enzimas e/ou bile ajudam na digestão dos alimentos, isso pode ser especialmente interessante para pessoas que não conseguem digerir proteínas adequadamente. A bromelina também previne a agregação plaquetária excessiva, sendo um bom agente natural no decréscimo dos sintomas de angina e tromboflebite. Além disso, a bromelina reduz a espessura do muco, o que pode beneficiar pessoas com asma e bronquite crônica.

Com estas inúmeras possibilidades de aplicações e usos terapêuticos da bromelina e o crescente desenvolvimento da biotecnologia, tornou-se necessário o conhecimento de novas técnicas de separação e purificação. Técnicas mais antigas - como a precipitação, extração com solventes e filtração - geralmente tem alto poder de concentração, contudo têm baixa eficiência na purificação. Por sua vez, técnicas mais modernas - como a cromatografia de afinidade, troca iônica ou gel-filtração, eletroforese, extração em duas fases aquosas, extração com micelas reversas - recuperam e purificam, muitas vezes até a homogeneidade. A utilização desta proteína, visando as diversas aplicações mencionadas acima, está condicionada a 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. Assim, este trabalho faz uma análise da

atividade enzimática de uma solução de Bromelina P.A. da Sigma-Aldrich, na concentração de 0,2% (m/v) em diferentes condições de pH e temperatura a fim de encontrar a melhor condição de seu armazenamento.

## **2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1. Proteínas**

Proteína vem do grego *protéicos*, que significa *primeiro* entre todos os compostos químicos. As proteínas devem certamente ser colocada em primeiro lugar já que são um dos principais constituintes dos organismos animais, mantêm as diferentes partes conjuntamente e dirigem o seu funcionamento. São encontradas em todas as células vivas. São os principais constituintes da pele, dos músculos, dos tendões, dos nervos e do sangue; das enzimas, anticorpos e muitos hormônios (MORRISON, 1976). São as moléculas orgânicas mais abundantes nas células e constituem 50% ou mais de seu peso seco. Existem muitas espécies diferentes de proteínas, cada uma especializada em determinada função biológica diferente.

Quimicamente, as proteínas são altos polímeros. São poliamidas. Os monômeros de que elas são formadas são os ácidos  $\alpha$ -amino-carboxílicos. Uma única molécula de proteína contém centenas ou mesmo milhares de unidades de aminoácidos; estas unidades podem ser de cerca de vinte espécies diferentes. O número de combinações distintas, ou seja, o número de diferentes moléculas protéicas, que são possíveis, é quase infinito (MORRISON, 1976).

Sua estrutura pode ser considerada em vários níveis. A estrutura primária é o modo como os átomos da molécula protéica se unem uns aos outros por ligações covalentes formando cadeias peptídicas. A estrutura secundária é o modo segundo o qual estas cadeias se dispõem espacialmente, formando hélices, folhas ou esferóides compactos, com ligações de hidrogênio a unir diferentes cadeias ou diferentes partes da mesma cadeia. E assim, o entrelaçamento das

cadeias helicoidais uma nas outras, com formação de tranças a vários cabos, ou o amontoamento de moléculas uma sobre as outras, com formação de agregados maiores, vão formando os níveis mais altos da estrutura das proteínas. (MORRISON, 1976).

### **2.1.1. Enzimas**

Enzimas são moléculas de proteínas bastante grandes e complexas que agem como catalisadores em reações bioquímicas. Como as proteínas, elas consistem em longas cadeias de aminoácidos unidas por ligações de peptídeos. Elas são formadas dentro das células de todos seres vivos, plantas, fungos, bactérias, e organismos microscópios unicelulares. As enzimas são classificadas segundo os compostos nos quais elas agem. Por exemplo, lípases atuam nas gorduras decompondo-as em glicerol e ácidos graxos, amilases decompõem o amido em açúcares mais simples, celulasas decompõem a celulose, proteases decompõem as proteínas, entre outras.

Depois dos antibióticos, as enzimas são os produtos mais explorados na indústria de biotecnologia. São biocatalizadores que as células utilizam para uma série de conversões químicas. A ação catalítica se faz, como a dos catalisadores inorgânicos, através da redução da energia de ativação da reação, sem alteração do seu equilíbrio termodinâmico. Além de reduzirem a energia de ativação, incrementando a velocidade da reação, as enzimas apresentam elevada especificidade. As reações para digerir alimentos, enviar sinais através de nervos, ou contrair um músculo, por exemplo, simplesmente não ocorrem em velocidade útil sem catálise.

Deste modo, a catálise enzimática das reações é essencial para os sistemas vivos. Sob condições biológicas relevantes, as reações não catalisadas tendem a serem lentas já que a maioria das moléculas biológicas é muito estável no ambiente aquoso de pH neutro e temperatura moderada encontradas no interior das células. Muitas reações bioquímicas comuns envolvem eventos químicos que são muito 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. (LEHNINGER, 1995).

Uma enzima contorna estes problemas fornecendo um ambiente específico dentro do qual uma reação dada é energeticamente mais favorável. A característica distintiva de uma reação catalisada enzimaticamente é que ela ocorre no interior dos limites de uma cavidade, ou fenda, na estrutura molecular da enzima chamada sítio ativo. A molécula que se liga ao sítio ativo e que sofre a ação da enzima é chamada substrato. O complexo enzima-substrato tem papel central na reação enzimática, ele é o ponto de partida para os tratamentos matemáticos que definem o comportamento cinético das reações catalisadas enzimaticamente e para as descrições teóricas dos mecanismos enzimáticos. (SARTORELLO, 2004).

### **2.1.2. Desnaturação**

Todas as moléculas de uma mesma proteína apresentam, em condições fisiológicas, a mesma conformação que é denominada nativa. Esta 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 esta e seu meio ambiente. Ao se proceder 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. Neste caso, a proteína é dita, então, desnaturada (CAMPESE, 2004).

Desnaturação é a precipitação irreversível das proteínas, na medida em que lhe causa uma modificação fundamental que destrói sua atividade fisiológica. A coagulação da clara do ovo pelo calor, por exemplo, representa a desnaturação de uma proteína, a ovoalbumina. A facilidade extrema com que muitas proteínas se desnaturam torna o seu estudo muito difícil. A desnaturação causa modificações fundamentais nas proteínas, destruindo, em particular, a sua

atividade fisiológica. (MORRISON 1976). 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. 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 desnaturação de proteínas pode ser provocada não apenas pelo calor (o aquecimento da proteína nativa provoca rompimento de ligações não-covalentes), 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, presença de certos íons ou sais na solução que contém as proteínas, entre outros. Segundo CAMPESE (2004), por exemplo, valores de pH muito baixo ou muito alto, afetam a ionização dos grupamentos da proteína conferindo à molécula uma elevada carga positiva (ou negativa), ocasionando repulsão intramolar, com exposição do interior hidrofóbico. A adição de solventes orgânicos polares (álcoois, por exemplo) ou de compostos com grande capacidade de formar pontes de hidrogênio (uréia, por exemplo) determina a desnaturação da proteína, porque estes últimos agentes estabelecem pontes de hidrogênio com radicais da proteína, substituindo ligações que mantêm a estrutura nativa.

Os solventes orgânicos diminuem a solvatação dos radicais polares situados na superfície da proteína. A desnaturação também pode ser ocasionada por detergentes. Uma molécula típica de detergente é composta por uma cadeia longa apolar ligada a um grupo terminal carregado eletricamente. Estes agentes são desnaturantes porque a introdução de sua cauda hidrofóbica (apolar) no interior da proteína rompe interações hidrofóbicas (CAMPESE, 2004).

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. Retiradas das condições desnaturantes, muitas proteínas podem reassumir sua

conformação nativa em um processo chamado renaturação. A renaturação demonstra que a estrutura tridimensional (nativa) de uma proteína é uma consequência de sua estrutura primária.

ARROYO-REYNA et. al. (1995) estudaram a desnaturação térmica da bromelina, que é uma proteína globular. Estudos cinéticos da desnaturação da bromelina a uma temperatura constante foram realizadas a pH 3,40. A análise da fração de proteína nativa ( $f_N$ ) mostra que esta varia com o tempo, sendo que à temperaturas elevadas, esta diminui mais rapidamente. Por exemplo, a 30,5°C,  $f_N$  diminui de 1 a aproximadamente 0,2 em 300 min; a 36,1°C,  $f_N$  diminui a aproximadamente 0,1 em 300 min; a 42,3 °C,  $f_N$  diminui de 1 a 0 em 150 min e a 46,1 °C,  $f_N$  diminui de 1 a 0 em 50 min. Foram realizadas análises entre 30 e 50 °C. Este estudo indica que a desnaturação térmica da Bromelina segue um modelo de dois estados irreversível com cinética de 1ª ordem. Neste estudo a desnaturação é determinada por mudanças na conformação da enzima.

### **2.1.3. Bromelina**

Por bromelina entende-se o conjunto de enzimas proteolíticas produzidas por plantas da família das *Bromeliaceae*. O abacaxi é o vegetal mais conhecido da família *Bromeliaceae*. De acordo com CÉSAR et al. (1999), a enzima não está presente nos primeiros estágios de desenvolvimento do fruto, porém seu nível aumenta rapidamente, mantendo-se elevado até o amadurecimento, quando tem um pequeno decréscimo. Essa é uma das vantagens da utilização das proteases do abacaxi em comparação com outras proteases vegetais. Apesar da diminuição da atividade proteolítica durante a maturação, o abacaxi é o único fruto que possui concentrações relativamente altas de proteases no estado maduro. No mamão e no figo, tanto a papaína quanto a ficina, somente são encontradas em altos níveis quando o fruto está verde; com o completo amadurecimento, a concentração de proteases praticamente desaparece.

Para obtenção da bromelina, podem ser utilizadas diferentes partes do abacaxi: folhas, talos, polpa da fruta, cascas e resíduos industriais do

processamento do fruto. O fruto e o talo apresentam o mesmo teor de proteína total, porém o talo apresenta cerca de 60% menor quantidade de enzimas proteolíticas. 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 comercial é obtida do caule do abacaxi após moagem, prensagem, filtração e precipitação do suco deste talo. Muitos precipitantes clássicos podem ser utilizados na preparação da enzima bruta ou no fracionamento da enzima, tais como: sulfato de amônio, metanol, isopropanol e acetona, combinados com variações do pH do suco. Contudo, no caso da preparação industrial, a acetona é o precipitante mais conveniente. A acetona é adicionada ao suco do talo em dois estágios. Quando um ou dois volumes de acetona são adicionados a dois volumes de suco de caule de abacaxi, o precipitado formado tem baixa atividade enzimática, cor turva e baixa estabilidade, sendo descartado. A adição de um outro volume de acetona precipita as principais frações enzimáticas. Estas são coletadas através de centrifugação, sendo posteriormente secas. O pó seco é a proteína do talo. A acetona é recuperada, destilando-se o sobrenadante resultante da centrifugação (LIMA, 2001). A precipitação com etanol a frio também é uma opção estudada para extração das enzimas proteolíticas encontradas no abacaxi.

CÉSAR (2000) estudou a extração da bromelina, utilizando sistemas aquosos bifásicos formados por PEG/sal (fosfato de potássio). Foram obtidos resultados favoráveis e promissores. Obteve-se o coeficiente de partição de aproximadamente 3,9 com pH 9,0, PEG 1500 e concentração de 17,5% PEG e 15% de sal.

CÉSAR (1999) realizou as análises de proteína total, açúcares redutores e atividade enzimática de amostras preparadas da polpa do fruto, da casca e do talo para a caracterização do meio inicial. O fruto e talo apresentam o mesmo teor de proteína total, porém o talo apresenta cerca de 60% menor quantidade de enzimas proteolíticas. Foi observado que por meio da precipitação em um estágio com 80%

(v/v) de etanol a 5°C, é possível recuperar praticamente toda a enzima originalmente presente, aumentando de 3 a 5 vezes a atividade específica inicial.

A bromelina do talo do abacaxi contém várias proteases que diferem entre si na sua ação em diversos substratos, bem como na suscetibilidade em oxidar-se e reduzir-se, e especialmente no pH que elas hidrolisam mais rapidamente seus substratos. O pH ótimo de atividade é influenciado pela natureza do substrato, pela concentração e tipo de solução tampão utilizada e também pela presença de agentes redutores. Para auxiliar na classificação dessas enzimas, as proteases são designadas pelo pH ótimo de atividade, tendo-se verificado que a bromelina comercial é uma mistura de quatro proteases: bromelinas pH 4,5; 5,5; 7,0; 8,5. (LIMA, 2001).

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, o que 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). Segundo ROWAN (1990), a bromelina do fruto possui atividade proteolítica maior do que a bromelina do talo em diversos substratos protéicos, sendo sua atividade máxima em pH 8,0 e temperatura de 70°C. A atividade máxima da bromelina do talo ocorre em pH 7,0 e temperatura de 60°C.

SUH et. al. (1992) purificou a bromelina do fruto e do talo até a homogeneidade (18 e 46 vezes de aumento de pureza respectivamente) por cromatografia de gel-filtração e determinou os pesos moleculares em 32,5 e 35 kDa respectivamente, com rendimento de 23 % em atividade. MURACHI (1976) purificou a bromelina do talo do abacaxi por cromatografia de gel filtração, e determinou que o pesos molecular da fração pura era de 28 kDa por SDS-PAGE. ROWAN et. al. (1990) descreve a presença de quatro proteases principais presentes em abacaxis (*Ananas comosus*): bromelina de fruto, bromelina de talo, ananaína e comosaína.

Além dessas proteases, a bromelina do talo de abacaxi também contém outras enzimas, sendo uma fonte de fosfatase ácida. Esta é uma enzima relativamente estável e não se deteriora rapidamente sob armazenagem. A bromelina quando recém preparada, contém também peroxidase. Contudo, em contraste com a estabilidade de estocagem da fosfatase ácida, a peroxidase do talo de abacaxi é muito lábil. Após três a seis meses de armazenagem o teor de peroxidase praticamente desaparece. Esse comportamento é semelhante à peroxidase do látex do fruto da *Carica papaya*. (LIMA, 2001).

EL-GHARBAWI e WHITAKER (1963) separaram cinco componentes proteoliticamente ativos da bromelina do talo por cromatografia e eletroforese. Esses componentes apresentaram absorvância similar a 280 nm e atividade específica similar em caseína em pH 7. Eles diferem entre outras características, na absorvância a 260 nm e 292 nm, estabilidade térmica e variação na atividade em caseína em diferentes valores de pH. Todos cinco componentes tiveram aproximadamente a mesma atividade específica em pH 7 (aproximadamente 1,02 ou 1,03). Todos os componentes parecem ter ponto isoelétrico de aproximadamente 9,6.

Segundo BALDINI et. al. (1993), a bromelina é uma enzima sulfídrica e como característica das enzimas pertencentes a esse grupo, requer grupamentos sulfídricos livres para sua atividade catalítica. Agentes redutores como a cisteína, sulfetos, sulfitos, e também cianetos atuam como ativadores da ação enzimática de acordo com diversos autores citados em seu trabalho.

#### **2.1.4. Proteases**

A quebra proteolítica de ligações peptídicas é umas das mais freqüentes e importantes modificações enzimáticas das proteínas. Historicamente, proteólise enzimática tem geralmente sido associada com a digestão de proteínas e atraiu a atenção de fisiologistas e bioquímicos que estavam interessados no processo de digestão das proteínas nos animais e homens. Assim as proteases digestivas das secreções pancreática e gástrica estão entre as enzimas melhor caracterizadas e

muito do atual conhecimento da estrutura da proteína e da função das enzimas tem sido derivado do estudo destas proteases. Investigações da cinética, especificidade e inibição, junto com detalhadas análises de sua seqüência de aminoácidos e estrutura têm levado à identificação dos componentes e geometria de seus sítios ativos, e assim o mecanismo de ação destas proteases digestivas sido deduzido. (BEYOND, 1989)

Atualmente, a classificação das proteases é baseada na comparação de sítios ativos, mecanismos de ação e estrutura tri-dimensional. Cada família de proteases tem um característico grupo de resíduos de aminoácidos funcionais arranjados em uma particular configuração para formar o sítio ativo. (BEYOND, 1989). As proteases vegetais papaína e bromelina são classificadas como “cysteine proteases”, sendo a papaína o membro mais estudado desta família de proteases.

As enzimas proteolíticas (proteases) são de grande valor comercial, e são amplamente utilizadas nas indústrias de biotecnologia. Na indústria de alimentos são usadas nos processos de fermentação e produção de alimentos orientais, na produção de gelatina hidrolisada e leite de soja e na clarificação de sucos através da hidrólise das proteínas solúveis. Também são usadas na produção de cervejas, para hidrólise das proteínas responsáveis pela sua turvação. Na indústria de panificação, são utilizadas para a produção da massa macia, com o resultado da hidrólise do glúten, na fabricação de queijos para maturação e desenvolvimento da textura e do sabor, na indústria de carnes para tenderização e condicionamento, e para o melhoramento de alimentos para animais. São também amplamente empregadas em detergentes, na indústria de papel e de couros, e algumas proteases de origem animal entre as quais destaca-se pepsina, tripsina, quimotripsina, utilizadas na preparação de alimentos infantis.

## **2.2. Abacaxi**

### **2.2.1. Fruticultura Brasileira**

A fruticultura brasileira cresceu consideravelmente nos últimos dez anos, como podemos observar utilizando os dados comparativos de produção dos biênios 1994/1995 e 2004/2005 apresentados na Tabela 1.

FRUTA	2005	2004	1994	1995
Abacaxi	2.279	2.297	1.558	1.463
Banana	6.606	6.691	7.438	7.384
Laranja	17.998	18.270	14.213	16.004
Maçã	827	973	456	432
Uva	1.133	1283	807	825

Tabela 1 - Produção de Frutas, Brasil – 1994/1995 e 2004/2005 (1000 toneladas). Fonte: IBGE (07/2005) Fatores de conversão: abacaxi: 1,6 kg/fruto; banana 13kg/cacho; maçã 130gramas/fruta; laranja 250 frutos por caixa com 40,8 kg.

No Estado de São Paulo, devido aos diferentes ciclos de maturação (desde muito precoces até tardias) e as diversas regiões de cultivo, pode-se dizer que a época de colheita das frutas se estende por nove meses até pelo ano todo. No caso das frutas de clima temperado e subtropical a colheita se inicia em setembro e se prolonga até junho, enquanto que para tropicais pode durar o ano todo.

Em razão de sua posição geográfica e do cultivo das variedades especialmente criadas ou adaptadas para as condições de inverno brando, com poucas horas de frio abaixo de 7,2<sup>o</sup>C, a produção paulista é mais precoce que as dos estados do Sul do Brasil, assim como de países produtores como Argentina, Uruguai e Chile, o que traz vantagens econômicas, devido a ausência de concorrentes no início da safra. Ao mesmo tempo, para várias espécies permite-se que sejam exportadas para países do hemisfério Norte quando não há produção regional tendo condições de adentrarem os mercados com redução ou ausência de tarifas aduaneiras de importação (CÉSAR, 2005).

## 2.2.2. Cultivo e cultura

O abacaxizeiro é uma planta muito sensível ao frio, mas resiste bem à seca. Exige, por isso, clima quente ou mesotérmico, onde não há perigo de ocorrência de geadas. A temperatura média favorável situa-se entre 21 e 27°C. Quando a temperatura se mantém acima de 32°C, verificam-se danos na planta devido à transpiração excessiva, quando a temperatura cai abaixo de 20°C, a planta entra em estado de inatividade (MEDINA, 1978). Portanto, o Brasil possui um clima muito favorável para a produção do fruto. Na Tabela 2 podemos observar que o país encontra-se em segundo lugar no ranking mundial de produção do fruto, contribuindo com mais de 13% da produção mundial.

ABACAXI	PRODUÇÃO(t)	PRODUÇÃO(t/ha)
Mundial	15.288.018	843.231
	PRODUÇÃO (t)	PRODUÇÃO (t/ha)
Tailândia	1.900.000	87.000
Filipinas	1.759.290	48.230
Brasil	1.435.190	54.683
China	1.320.000	70.500
Índia	1.300.000	90.000

Tabela 2: Produção mundial de abacaxi em 2005. Fonte: FAO (2005). Atualizado em fevereiro/2005.

Os frutos colhidos durante o verão apresentam melhor qualidade do que os amadurecidos durante o inverno. Aqueles se apresentam mais aromáticos e mais ricos em sólidos solúveis, menos ácidos e com maior conteúdo de óleos voláteis.

O momento da colheita depende do fim a que se destinam os frutos. Se for para a fabricação de conservas, deve-se aguardar até que os frutos fiquem maduros, ou seja, o momento em que suas qualidades organolépticas sejam

ótimas. Mas, se destinados à exportação como fruta fresca, a colheita deve ser feita com antecipação para que sua maturação total não ocorra até o momento em que seja ofertado ao consumidor. É preciso, contudo, neste caso, não colher frutos demasiado verdes.

A coloração da casca é habitualmente tomada como indicação para julgar se um fruto está ou não maduro. A madureza da polpa e a coloração da casca ocorrem progressivamente, iniciando-se ambas pela base do fruto e se estendendo paulatinamente para o ápice. Tal avaliação, contudo, é muito mais difícil do que parece à primeira vista, pois há necessidade de se levar em conta o tamanho do fruto, as condições ecológicas, por ocasião da sua maturação e variedade do produto.

O abacaxizeiro frutifica dentro de 24 meses após o plantio, quando as mudas são do tipo coroa. De modo geral, pode-se obter 15 a 20 mil frutas por hectare, por safra, servindo este valor como média para as variedades.

A época da colheita está intimamente relacionada à época de plantio e ao tipo e idade da muda. O plantio no Estado de São Paulo é feito de dezembro a fevereiro, no período que coincide com a colheita das frutas (época de maior produção) e, conseqüentemente, época favorável para obtenção de mudas.

As colheitas das frutas de um abacaxizal não podem ser feitas por meios mecânicos, pois as frutas não amadurecem todas ao mesmo tempo. Todavia, no Havaí e em outras regiões onde a cultura do abacaxi é feita com alto nível técnico, os trabalhos de colheita são grandemente facilitados graças à utilização de uma esteira rolante, na qual as frutas são colocadas e transportadas para fora dos talhões tão logo sejam colhidas.

No Brasil, o trabalho de colheita geralmente é feito com auxílio de um facão, com o coletor tendo as mãos protegidas por luvas de lona grossa. Enquanto com a mão esquerda segura o fruto pela coroa, com a direita secciona, com o facão, a haste a 5-6 cm abaixo da fruta. As frutas colhidas vão sendo entregues a outro operário, que é encarregado de transportá-las em cestas até a margem do carreador. Necessita-se, em média, três carregadores para cada colhedor. Tem uma produtividade média de 30.000 a 40.000 frutos/ha/ano (CÉSAR, 2005).

Em geral, a comercialização do abacaxi é feita com o fruto ainda no campo, antecipadamente e a granel. Leva-se em conta o tamanho e a aparência do fruto, de acordo com os padrões das variedades. Para os grandes mercados consumidores ao natural, seguem os frutos de primeira qualidade, sadios e com peso igual ou acima de 1,5 kg. Os que não atingem esse padrão são vendidos nos mercados locais, perto das regiões produtoras, ou são destinados à industrialização.

### **2.2.3. Composição Química**

O abacaxi apresenta uma variação muito grande na sua composição química, de acordo com a época em que é produzido. De modo geral, a sua produção ocorre no verão, sendo sua colheita uniformizada através da indução química do seu florescimento.

Neste caso, as frutas apresentam maior teor de açúcares e menor acidez. Por outro lado, as frutas produzidas fora de época, ou seja, as frutas temporãs, apresentam alta acidez e baixo teor de açúcares, visto a produção ocorrer nos meses que a temperatura ambiente é baixa .

O valor nutricional das frutas de abacaxi depende, principalmente, dos seus açúcares solúveis, das vitaminas e dos sais minerais que contém, uma vez que os teores de proteínas e de lipídeos são relativamente baixos.

O abacaxi é uma fruta deliciosa, muito apreciada em todos os países tropicais; sua polpa sucosa, saborosa e ligeiramente ácida é muito refrescante. Ao lado das qualidades organolépticas, que o distinguem universalmente, há seu alto valor dietético, comparável ao das melhores frutas tropicais. O suco de abacaxi é um alimento energético, pois um copo do mesmo propicia cerca de 150 calorias ao organismo humano. O teor de açúcares varia em geral em torno de 12 a 15%, dos quais aproximadamente 66% são de sacarose e 34% de açúcares redutores. As cinzas, que apresentam 0,4-0,6% do peso total, são ricas em bases, principalmente em potássio, ao qual seguem o magnésio e cálcio, geralmente em partes iguais, e essas características permanecem em sua maioria nos resíduos

triturados do abacaxi para o processamento da bromelina, sendo então este resíduo de grande interesse por suas características de alta riqueza nutricional.

#### **2.2.4. Processamento da fruta**

A fruta em calda, que é o principal produto industrializado do abacaxi, ocupa, atualmente, a segunda posição em vendagem no mercado internacional, logo em seguida do pêssego em calda.

As técnicas industriais de preparo de fatias e pedaços para enlatamento são conhecidas internacionalmente. Linhas completamente automatizadas encontram-se em várias fábricas espalhadas pelo mundo tais como Havaí, Formosa, Filipinas, Tailândia, Austrália, África do Sul e outros países, no mundo todo.

Essas linhas, em capacidade de 80 a 120 frutas por minuto, apresentam, atualmente, rendimentos próximos de 46% de partes sólidas da fruta para enlatamento.

#### **2.2.5. Produtos e Subprodutos do Processamento.**

Na grande indústria do abacaxi, a industrialização da fruta é integrada. Isso significa que não existe uma indústria trabalhando com um ou dois produtos, mas procura-se tirar o máximo de rendimento da fruta em relação ao produto principal (fruta em calda) e aos produtos de caráter secundário (como é o caso do suco simples e do suco concentrado), e mesmo os subprodutos, como é o caso específico do suco da casca e resíduos e da ração, esta última utilizada na alimentação animal.

O processamento tem início com a lavagem das frutas, que chegam do campo em grandes recipientes ou carretas, já desprovidas da coroa que pode ser utilizada para o replantio da fruta. A seguir, as frutas são conduzidas por meio de

transportadoras para uma seção superior onde a lavagem é completada. Um sistema de transportadores conduz as frutas lavadas para um segundo pavimento, no qual, é feito um corte em uma das extremidades da fruta. Essa operação tem por finalidade principal eliminar as partes restantes da coroa e talo, a fim de facilitar o trabalho posterior da máquina ginaca. Essas partes eliminadas seguem, por meio de um transportador, para a linha de processamento de ração.

Na etapa seguinte, ainda no segundo pavimento, as frutas são selecionadas por tamanho, seleção esta que é feita por meio de roscas sem fim, dispostas de tal forma que permitem a classificação das frutas em três tamanhos distintos: grande, médio e pequeno.

As frutas de tamanho médio constituem aproximadamente 60 a 65% do total de abacaxis que entram na usina de processamento.

O processo tem por finalidade dar um fluxo contínuo às fases posteriores, reduzindo assim a capacidade ociosa da ginaca. Esta máquina cujo nome foi dado em homenagem a seu inventor o engenheiro havaiano de sobrenome Ginaca, é completamente automatizada e de grande capacidade (80-120 frutas por minuto), executando uma série de operações sucessivas, e que são as seguintes: - corte das extremidades, descascamento da fruta e encaminhamento do cilindro à etapa seguinte do processamento. O equipamento também é dotado de um dispositivo raspador, que erradica a polpa da casca e das extremidades do fruto. A maior parte deste material erradicado (polpa erradicada) se destina à produção de “*crush*” (espécie de salada de frutas) e uma pequena parte à produção de suco.

Nas ginacas de produção mais antiga também havia um dispositivo para remoção do miolo do cilindro da fruta

Dentro de um sistema mais moderno, conhecido como “sistema de processamento de abacaxi em dois diâmetros” da Honiron, a remoção da parte central do cilindro da fruta é feita em fase posterior. Esse sistema permite maior rendimento industrial em termos sólidos, pois o cilindro é cortado em fatias quando ainda inteiro, isto é, com miolo, e estas apresentam maior resistência mecânica à remoção do miolo, reduzindo-se assim, o número daquelas quebradas.

Nas diversas linhas de ginaca geralmente encontradas nas grandes indústrias de abacaxi do mundo, a máquina é usualmente regulada para o processamento de frutas dos três tamanhos anteriormente mencionados.

Pode-se então observar aqui, uma boa fonte da matéria prima a ser utilizada no processo de recuperação e purificação de enzimas do abacaxi, visto que, uma das maiores dificuldades da indústria de processamento do fruto é a venda do suco, obtido como subproduto e posteriormente reprocessado, tratado, pasteurizado e embalado para comercialização em um mercado que não responde à produção de suco devido ao seu alto custo ocasionado pelo tratamento.

Do total de frutos produzidos nos Estados Unidos da América em 2003, aproximadamente 73% foram industrializados (FAO, 2005) e os restantes 27% consumidos na forma fresca. Do total mundial industrializado, 46% foram comercializados no mercado mundial, com seu valor de mercado quintuplicado graças aos custos de processamento, embalagem e distribuição.

O Brasil diferencia-se completamente dos grandes produtores e consumidores mundiais de abacaxi, pois quase toda sua produção é consumida na forma fresca, sendo a quantidade industrializada insignificante.(BERTEVELLO, 2001). Portanto, uma das principais fontes de matéria prima para a extração de enzimas no Brasil, não seriam os subprodutos do processamento e sim os resíduos agrícolas, especialmente a sua haste (*stem*) que tem demonstrado bons resultados nos mais recentes estudos de extração e purificação (RABELO, 2004) e nas aplicações terapêuticas da Bromelina (MYNOTT, 1999).

### **2.3. Aplicações de enzimas**

As aplicações de enzimas estão obviamente vinculadas ao mercado mundial e podem ser divididas em aplicações industriais, enzimas para uso médico e enzimas para uso analítico e científico. As principais aplicações, principalmente industriais, estão dentro do que se convencionou chamar de biotecnologia, termo este que transformou-se na última década numa panacéia de atividades ligadas à ciência e tecnologia, que tornou-se difícil definir exatamente

campos de atuação específicos mas certamente envolve microbiologia, bioquímica, genética e engenharia química e bioquímica no processamento de materiais por agentes biológicos. Dentre esses agentes, as enzimas são freqüentemente utilizadas para melhoria de processos e possibilitar o uso de novas matérias-primas, melhorando suas características físico-químicas e também as de vários produtos (LIMA, 2001).

Do ponto de vista industrial, para ser comercialmente utilizável, a enzima deve proporcionar a obtenção de produtos com as seguintes características: ser de melhor qualidade que o produto tradicional, possibilitar uma melhoria no processo, de tal forma a reduzir custos de laboratório e maquinaria envolvidos, possibilitar a produção de produtos que não são disponíveis ou somente em pequenas quantidades. Em um amplo campo de aplicações, as enzimas podem ser úteis no melhoramento da qualidade de diversos produtos, facilitando sua obtenção, ou produzindo um intermediário que seria difícil de ser obtido quimicamente. Um exemplo desta intervenção desejada das enzimas são as lipases na manufatura de queijos, mediante a qual acelera-se o processo de cura, assim como as pectinases e amilases na fabricação de sucos de frutas, que atuam na obtenção da viscosidade e na clarificação destes produtos. Também no caso da clarificação de cervejas e amaciamento de carnes, as proteases podem ser grandes aliadas destes processos industriais.

Entre as diversas indústrias químicas, nenhuma teve modificação fundamental de matérias-primas tão grande quanto a indústria de saboaria. Entre 1940 e 1965, os detergentes passaram a responder por 80% da demanda anterior em sabões. Em 1975, bem mais de 80% do mercado estavam cobertos por novos detergentes que utilizavam matérias-primas completamente novas, dentre elas as enzimas. A substituição dos sabões por produtos sintéticos se deu basicamente por aspectos econômicos e técnicos, uma vez que as gorduras se tornaram cada vez mais escassas e destinadas à alimentação humana e também à formação de sais insolúveis com os agentes de dureza da água como o cálcio o magnésio; além da insolubilização em meio neutro e ácido levaram à intensificação das pesquisas em torno da utilização das enzimas (LIMA, 2001).

O aparecimento de enzimas adequadas, estáveis em pH alcalino, obtidas por fermentação de bactérias, podendo ser obtidas em maiores quantidades e menor tempo, com menor custo, possibilitou o uso de enzimas também em detergentes líquidos que estão em pleno crescimento no mercado, devido à sua praticidade e fácil incorporação dos tensoativos e outros componentes na água.

Na indústria têxtil e em curtumes as enzimas também encontram aplicação. No processamento de couros as proteases encontram uma ampla aplicação durante as várias fases (LIMA, 2001). Na fase inicial de limpeza é necessário haver uma reidratação, passando pela remoção dos pelos, onde é utilizada uma protease alcalina (subtilisina), porque o pH básico ajuda na exposição dos folículos pilosos, facilitando sua remoção. Nas fases iniciais, onde é necessária uma degradação parcial da queratina e elastina presentes, existindo também a ação devido à quebra do colágeno. As proteases mais utilizadas são as de origem animal, fúngica e bacteriana, mas em alguns casos especiais, como produção de couro extramacio, pode ser utilizada papaína.

Enzimas encontram também aplicação na produção de antibióticos. A molécula do antibiótico penicilina pode conter vários substituintes na cadeia lateral ao grupo 6-amino, resultando nas penicilinas semi-sintéticas. A molécula natural contém um grupo benzila ou fenoxi-metil (penicila G ou V, respectivamente). Produzida por fermentação, é posteriormente tratada com a enzima penicilina amidase (atualmente utilizada industrialmente na forma imobilizada) para a remoção da cadeia lateral, sem degradar o anel  $\beta$ -lactâmico e dando origem ao ácido 6-amino penicilâmico (6-APA), a partir do qual são produzidas as penicilinas sintéticas. As novas cadeias laterais podem ser adicionadas ao 6-APA por via química (atualmente a mais utilizada) ou enzimática, utilizando a reação inversa da penicilina amidase (em pH acima de 7) (LIMA, 2001).

### **2.3.1. Aplicações de enzimas em medicamentos e análises clínicas**

Grande parte dos medicamentos que estão no mercado originam-se de produtos naturais, em especial de plantas. Entre as vinte drogas mais vendidas

nos EUA em 1988, apenas sete não derivam diretamente de produtos naturais. Ainda assim, estes participaram em algum momento da história farmacológica destas drogas. Naturalmente o Brasil com a sua enorme biodiversidade, pode contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos produzidos a partir de plantas.

O Brasil já fez um considerável investimento na formação de investigadores e montagem de laboratórios. Houve um estímulo continuado no estudo de propriedades farmacológicas, na sua maioria, tentando comprovar a validade do uso popular de plantas medicinais. A idéia que presidia estes estudos era de utilizar os produtos naturais como substituição barata à terapia convencional. Porém, embora várias plantas estejam sendo utilizadas com fins terapêuticos (e mesmo comercializadas) a grande maioria não possui dados científicos que comprovem a sua eficácia e seu aspecto toxicológico no homem, assim como garantia de qualidade do produto ou de sua produção.

A especificidade e grande eficiência das enzimas tornam-nas de grande potencial para uso terapêutico. Dentre as enzimas atualmente em uso, destacam-se aquelas empregadas no tratamento de pacientes com alguma forma de leucemia, como por exemplo, L-asparaginase (obtida de *Escherichia coli* ou *Erwinia carotovora*). A base do tratamento é a degradação do aminoácido (L-asparagina) encontrado no plasma, e que é essencial à sobrevivência das células tumorais. No tratamento de tromboembolias, inclusive infarto do miocárdio, são utilizadas streptoquinase e uroquinase que, aplicadas por via intravenosa, iniciam o processo de dissolução de coágulos por ativação da fibrinolisa presente na corrente sanguínea (LIMA, 2001).

Várias proteases são utilizadas em alguns casos de condições inflamatórias, dentre elas as mais utilizadas são tripsina e quimotripsina, geralmente associadas a antibióticos ou analgésicos. A papaína, uma mistura de enzimas extraídas do látex do mamão, tem sido empregada com sucesso no debridamento de feridas, escaras e enxerto de pele.

Como já mencionado acima, no segmento de análises clínicas a bromelina é utilizada, em solução aquosa, no pré-tratamento de amostras de sangue a

serem tipadas para o Grupo ABO/Rh. A solução de enzima em contato com a superfície das hemácias propicia a retirada das proteínas de superfície, expondo melhor os antígenos eritrocitários, que responderão melhor ao teste analítico de tipagem.

Ainda em análises clínicas, as enzimas são muito utilizadas como reagentes na determinação da concentração de substratos, determinação da atividade de enzimas presentes em fluidos biológicos e também como marcadores em ensaios imunoenzimáticos. Sendo assim, podem ser chamadas de agentes de diagnóstico, principalmente quando se trata do seu uso em Análises Clínicas. Em enzimologia clínica, o que se procura é, através de doseamentos de atividade enzimática dos fluidos biológicos, diagnosticar qualquer alteração fisiológica provocada por possíveis doenças ligadas a determinados órgãos. Como exemplo de sua utilização, enquanto agente de diagnóstico, podemos citar a amilase no soro e urina, com aumento nos níveis normais pode indicar uma pancreatite aguda, carcinoma do pâncreas ou úlcera perforada; por sua vez, uma diminuição pode indicar mongolismo e também pneumonia. Algo parecido ocorre com a fosfatase ácida, a qual, se encontrada em níveis elevados, pode indicar câncer na próstata. A fosfatase alcalina pode indicar raquitismo e osteomalácia. Também a enzima lactato desidrogenase é um agente de diagnóstico, na medida em que sua presença em níveis elevados pode indicar infarto do miocárdio e distrofia muscular (LIMA, 2001).

### **2.3.2. Aplicações da bromelina**

Atualmente a indústria alimentícia não se apresenta como um mercado atrativo para utilização da bromelina, pois vem sendo largamente utilizada a papaína no amaciamento de carnes e a grande barreira seria romper o cartel de indústrias produtoras da enzima. Também existe a barreira de a África do Sul produzir e exportar papaína a preços sem concorrência a princípio. A indústria de cervejas, nas quais a bromelina também poderia ser utilizada como clarificante, aboliu a utilização da mesma, alegando esta enzima produzir resíduos de difícil

retirada dos tanques de armazenagem do produto. A concentração principal da utilização da bromelina está na indústria farmacêutica, uma das indústrias que mais investe em tecnologias e novos produtos nos últimos tempos.

A bromelina foi reconhecida como agente medicinal em 1957 e, desde então, mais de 200 documentos integraram a literatura medicinal. Tem sido utilizada pelos seus efeitos em todas as condições inflamatórias e em vários outros problemas como angina, indigestão e problemas respiratórios. É uma endopeptidase que não necessita de sistema precursor para desempenhar suas atividades farmacológica e terapêutica. Além disso, o *Ananás comosus* contém os cátions divalentes dos oligoelementos magnésio, manganês, zinco, ferro e cálcio, que atuam como cofatores nas funções das referidas enzimas.

A ação da bromelina inclui: inibição da agregação plaquetária, atividade fibrinolítica, ação antiinflamatória, 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)

As enzimas proteolíticas são também aplicadas em formulações tópicas com a finalidade de reduzir a espessura da camada córnea da pele por hidrolisar, em pontos específicos, a queratina cutânea. É um peeling mais suave e seguro, comparado aos tradicionais peelings químicos, e mais eficaz que os métodos físicos comumente usados em formulações cosméticas. (RACINE, 2004)

No segmento de análises clínicas, por exemplo, a bromelina é utilizada em solução aquosa no pré-tratamento de amostras de sangue a serem tipadas para o grupo ABO/Rh. A solução de enzima em contato com a superfície das hemácias

propicia a retirada das proteínas de superfície, expondo os antígenos eritrocitários, que responderão melhor ao teste analítico de tipagem.

O principal foco industrial da produção de bromelina é a indústria farmacêutica que é um dos setores que mais investe em tecnologias e novos produtos, tendo realizado uma previsão de investimentos no período de 1997 – 2000 de U\$ 1.300 milhões (ABIFARMA). Segundo César (2000), até bem pouco tempo atrás um novo remédio que era lançado no mercado brasileiro não tinha a sua fórmula protegida. Então, logo que era lançado, sem proteção legal, um concorrente logo aparecia. A proteção legal é muito importante na indústria de farmacológicos, pois se chega a gastar 15 anos com pesquisas, o que gera um investimento de capital em torno de U\$ 700 milhões. Esta proteção dura 20 anos a partir disso então a patente será de conhecimento público.

As plantações de abacaxi são culturas altamente padronizadas, que se desenvolvem em áreas sujeitas a variações climáticas mínimas. Para o comprador da bromelina, este é um dado muito importante, pois assegura um fornecimento constante e uniforme da enzima a um custo relativamente estável, estimulando assim a sua utilização nas diversas aplicações já citadas. Além do mais, em muitos aspectos, a produção de bromelina a partir do caule do abacaxi, poderia ser um exemplo clássico de um subproduto ideal. O pico de coleta dos talos e produção da enzima ocorre quando a colheita do fruto já está geralmente reduzida. Assim, parte do pessoal e equipamento destinado ao transporte da fruta poderia também ser utilizado no transporte dos talos. (LIMA, 2001)

## **2.4. Atividade enzimática**

### **2.4.1. Método espectrofotométrico**

Vários são os métodos utilizados para determinação da atividade catalítica de uma enzima, alguns deles são muito diretos, como a espectrofotometria. A espectrofotometria e a colorimetria são métodos analíticos de medida da

quantidade de luz absorvida por uma substância em solução. São normalmente utilizados em técnicas bioquímicas de determinação quantitativa de substâncias. Todas as substâncias em solução absorvem luz num determinado comprimento de onda e transmitem-na a outros comprimentos de onda.

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

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

I = intensidade da luz incidente

I<sub>0</sub> = intensidade da luz que conseguiu atravessar a amostra

T = Transmitância

A = Absorbância

a = absortividade

b = distância que a luz atravessa

c = concentração

Analisando-se detalhadamente os princípios regentes da Lei de Lambert-Beer, verifica-se que a representação da absorbância de um sistema absorvente em função da concentração molar da espécie absorvente, deve ser uma linha reta. No entanto, as medidas de absorbância dos sistemas químicos reais conduzem a uma não completa linearidade sobre toda a faixa das concentrações interessadas. Uma curvatura não significa necessariamente que não seja uma constante, independentemente da concentração. Mas quando isso ocorre tem-se um desvio real decorrente da limitação da própria lei, anteriormente enunciada.

Desvios reais ocorrem em consequência de interações que envolvem os centros absorventes e variação do índice de refração com a concentração. A Lei prevê que os centros absorventes atuam independentemente uns dos outros, isto é, manifestam interações recíprocas ou com íons e moléculas presentes. Esta restrição dá a Lei de Lambert-Beer o caráter de uma lei limite, que a rigor não se aplica apenas à descrição do comportamento das soluções diluídas ( $10^{-2}M$ ). No caso de soluções mais concentradas a distância média entre os centros absorventes diminui a tal ponto que as interações recíprocas dos centros absorventes, começam a afetar a distribuição das cargas nas espécies absorventes e excitadas e, assim também a energia necessária para a excitação. Conseqüentemente, podem ocorrer alterações na capacidade absorvente do sistema para um determinado comprimento de onda. Posto que a extensão da interação depende da concentração, a interação determina desvios da linearidade na relação entre absorbância e concentração.

A variação do índice de refração com a concentração decorre do fato de depender do índice de refração da solução. Quando variações de concentração afetam significativamente o índice de refração de uma solução, observam-se desvios reais. Em geral o efeito não é apreciável para concentrações inferiores a  $10^{-2}M$ .

A maioria dos desvios observados na prática da espectroscopia de absorção são apenas desvios aparentes que podem estar relacionados com a natureza do sistema químico envolvido e com as limitações do instrumento utilizado. Por exemplo, desvios químicos ocorrem quando a espécie absorvente sofre associação ou dissociação, ou então reage com o solvente. O sistema assim compreende um equilíbrio químico, facilmente afetado por efeito de diluição, variação de concentração, etc. Assim, desvios químicos são desvios aparentes, pois a Lei de Lambert-Beer estabelece que a absorbância é diretamente proporcional à concentração real da espécie absorvente, mas não necessariamente, à concentração analítica de um componente.

Desvios instrumentais também são desvios aparentes relacionados com as limitações do instrumento utilizado como, caráter finito da faixa espectral

isolada, radiações estranhas que alcançam o detector, não linearidade de resposta do detector e instabilidade da fonte.

Em análise quantitativa, é importante a escolha de um comprimento de onda mais adequado para a medida. Sempre que não haja motivo para proceder diferentemente, a medida de absorvância deve ser feita a um comprimento de onda correspondente a um máximo de absorção. Então, é maior a variação de absorvância por unidade de concentração, alcançando-se a sensibilidade máxima. Na prática, a relação entre a absorvância medida experimentalmente e a concentração da espécie é estabelecida com a construção de uma curva-padrão. Prepara-se para o elemento a determinar uma solução matriz. Com esta são obtidas, mediante diluição, as soluções padrão com as concentrações desejadas. As absorvâncias das soluções padrão são medidas e então traça-se a curva de calibração.

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1. Preparo das amostras**

Foram utilizadas como amostras solução 0,2% (0,2g/100mL ou 2g/L) de Bromelina P.A da Sigma-Aldrich nº catálogo: 16990 Lote: 444431/1 e Bromelina da polpa do abacaxi da espécie Pérola (descascados, triturados em liquidificador e o caldo obtido filtrado em pano de nylon para eliminação das fibras).

#### **3.2. Dados experimentais**

Para avaliação do efeito do pH na estabilidade da atividade enzimática da bromelina, o pH das amostras provenientes da solução de bromelina p.a foi ajustado para 4, 5, 6, 7, 8 e da polpa do abacaxi para 4 e 8 com tampão fosfato de potássio 0,1M (preparado a partir de fosfato de potássio monobásico e fosfato de potássio dibásico).

Após ajuste de pH, as amostras foram armazenadas primeiramente em geladeira a uma temperatura de 2° C e a atividade enzimática medida periodicamente.

Posteriormente, amostras recém preparadas de bromelina P.A. em pH 4 e 8 foram incubadas em Banho-Maria (Fanem 100) em diferentes temperaturas (2 °C, 25 °C, 35 °C, 45 °C e 55°C) e a atividade enzimática de cada uma delas determinada, logo após a amostra ter atingido as respectivas temperaturas.

A Tabela 3 apresenta as variáveis estudadas neste trabalho (Tempo, Temperatura e pH) para a Bromelina P.A.

A Tabela 4 apresenta as variáveis para Bromelina presente na polpa do abacaxi Pérola. São estas: Tempo, Temperatura e pH.

BROMELINA P.A		
Tempo (dias)	Temperatura °C	pH
0	2	4
0	2	5
0	2	6
0	2	7
0	2	8
5	2	4
5	2	5
5	2	6
5	2	7
5	2	8
12	2	4
12	2	5
12	2	6
12	2	7
12	2	8
25	2	4
25	2	5
25	2	6
25	2	7
25	2	8
0	2	4
0	2	8
0	25	4
0	25	8
0	35	4
0	35	8
0	45	4
0	45	8
0	55	4
0	55	8

Tabela 3: Variáveis estudadas para Bromelina P.A em solução.

BROMELINA - POLPA ABACAXI		
Tempo (dias)	Temperatura °C	pH
0	2	4
0	2	8
8	2	4
8	2	8
22	2	4
22	2	8
43	2	4
43	2	8

Tabela 4: Variáveis estudadas para Bromelina presente na polpa do abacaxi Pérola.

### **3.3. Determinação da Atividade Enzimática**

#### **3.3.1. Curva de calibração**

Para determinação da atividade enzimática da bromelina através da hidrólise da caseína foi construída uma curva de calibração com L-Tirosina P.A da Synth T1018.01.AD Lote: 67210 em diferentes concentrações, abrangendo a faixa de resultados obtidos nas amostras. As concentrações foram de 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 mM de tirosina e as determinações foram feitas em triplicatas.

#### **3.3.2. Atividade enzimática da bromelina**

Determinou-se a atividade proteolítica da bromelina através da hidrólise enzimática da caseína a 2% (m/v) pH 7,5 a 37°C durante 10 minutos, seguindo-se da precipitação do substrato não hidrolisado com solução de ácido tricloroacético (TCA). A quantidade de peptídeos solúveis em TCA (produtos hidrolíticos não precipitados) foi determinada em Espectrofotômetro UV-Vis (Spectronic 21D / Milton Roy) a 280nm, conforme modificações das metodologias propostas por KUNITZ, 1947 e WALTER, 1984. Utilizou-se Caseína Pura Synth C1014.06.AH Lote: 53971.

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

## **4. Resultados e Discussão**

### **4.1. Apresentação dos resultados obtidos**

BROMELINA P.A				
Tempo (dias)	Temperatura (°C)	pH	Atividade (U)	Perda de Atividade (%)
0	2	4	0,053	0,0
0	2	5	0,055	0,0
0	2	6	0,052	0,0
0	2	7	0,045	0,0
0	2	8	0,042	0,0
5	2	4	0,034	36,1
5	2	5	0,035	36,7
5	2	6	0,030	42,7
5	2	7	0,033	28,1
5	2	8	0,030	29,4
12	2	4	0,030	44,6
12	2	5	0,027	50,0
12	2	6	0,028	47,2
12	2	7	0,023	48,5
12	2	8	0,019	53,9
25	2	4	0,022	58,6
25	2	5	0,017	68,2
25	2	6	0,019	63,2
25	2	7	0,013	71,5
25	2	8	0,008	80,3
0	2	4	0,050	0,0
0	2	8	0,020	0,0
0	25	4	0,046	7,4
0	25	8	0,019	3,3
0	35	4	0,037	25,5
0	35	8	0,004	81,6
0	45	4	0,031	37,3
0	45	8	0,000	99,3
0	55	4	0,031	37,3
0	55	8	0,000	99,3

Tabela 5: Resultados de atividade enzimática obtidos para Bromelina P.A.

BROMELINA - POLPA ABACAXI				
Tempo (dias)	Temperatura (°C)	pH	Atividade (U)	Perda de Atividade (%)
0	2	4	0,088	0
0	2	8	0,031	0
8	2	4	0,088	0,4
8	2	8	0,025	20,5
22	2	4	0,086	2,4
22	2	8	0,024	21,8
43	2	4	0,078	10,8
43	2	8	0,022	28,2

Tabela 6: Resultados de atividade enzimática obtidos para Bromelina presente na polpa do abacaxi Pérola.

#### 4.2. Curva de calibração

A curva de calibração construída a partir de diferentes concentrações de tirosina, para determinação da atividade enzimática das amostras de bromelina está apresentada na Figura 4.1.1.

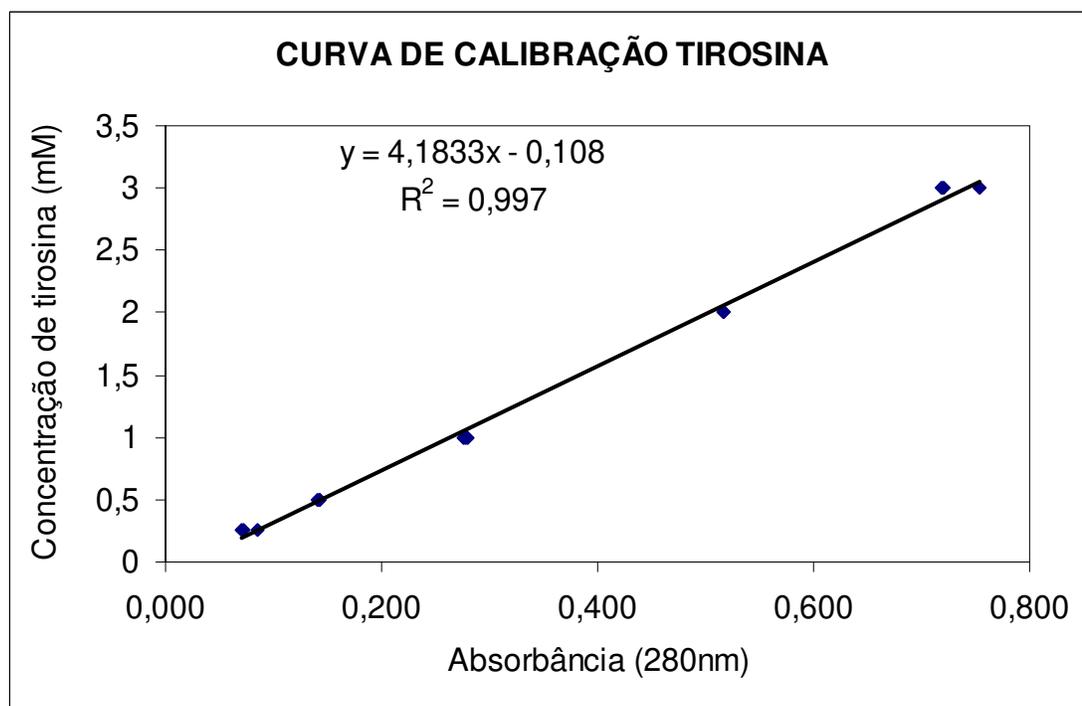


Figura 4.2.1 Curva de calibração tirosina para determinação da atividade enzimática da bromelina.

#### 4.3. Atividade enzimática da solução de bromelina p.a em função do tempo para diferentes valores de pH

A atividade enzimática das soluções de bromelina p.a em pH 4, 5, 6, 7 e 8 armazenadas em geladeira a temperatura de 2°C, foi determinada em triplicata logo após a preparação, no quinto, décimo segundo e vigésimo quinto dias.

As amostras de menores pHs apresentaram atividade proteolítica maior tanto inicialmente quanto com o passar dos dias, conforme figura abaixo.

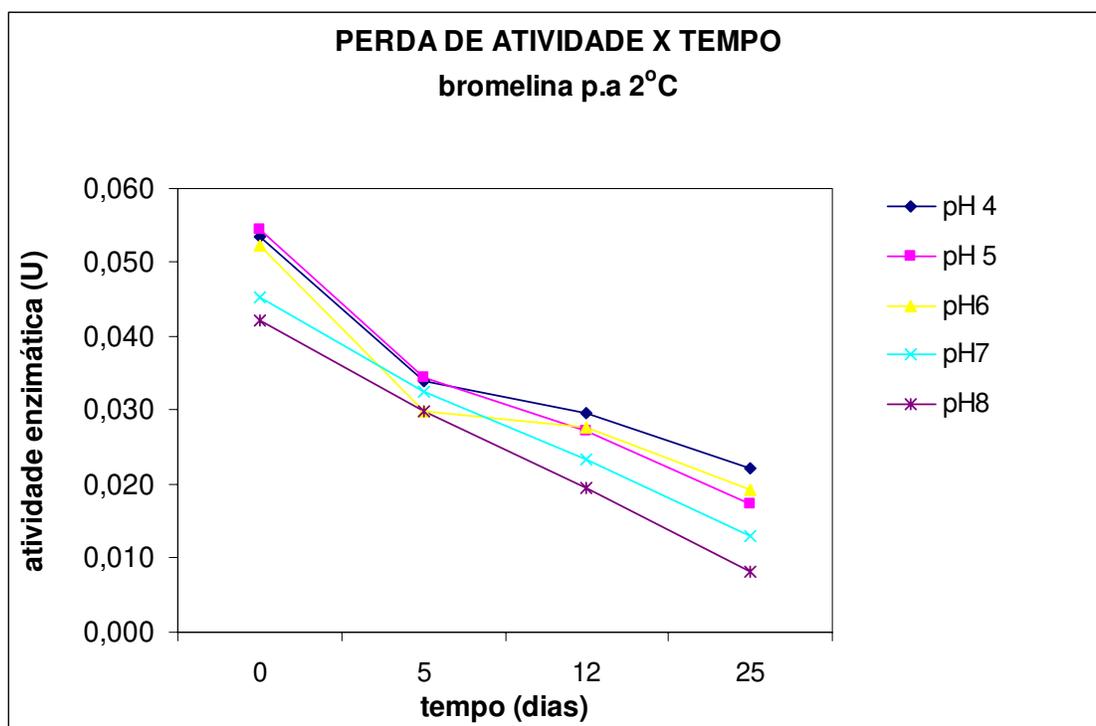


Figura 4.3.1- Atividade enzimática da bromelina p.a. em solução aquosa 0,2% (m/v) armazenada em geladeira (T = 2°C) em função do tempo.

Em pH 4 a bromelina apresentou uma queda total de 58,6% de sua atividade proteolítica após 25 dias de armazenamento em geladeira a 2°C,

enquanto em pH 8 a queda de atividade enzimática nestas mesmas condições foi de 80,3%.

As amostras com pH 5, 6 e 7 não apresentaram diferenças relevantes de perda de atividade enzimática. Para pH 5 a queda na atividade proteolítica após 25 dias de armazenamento em geladeira foi de 68,2%, enquanto para as amostras em pH 6 e 7, 63,2% e 71,5%, respectivamente.

O gráfico abaixo mostra a atividade proteolítica restante da solução de bromelina p.a no período estudado.

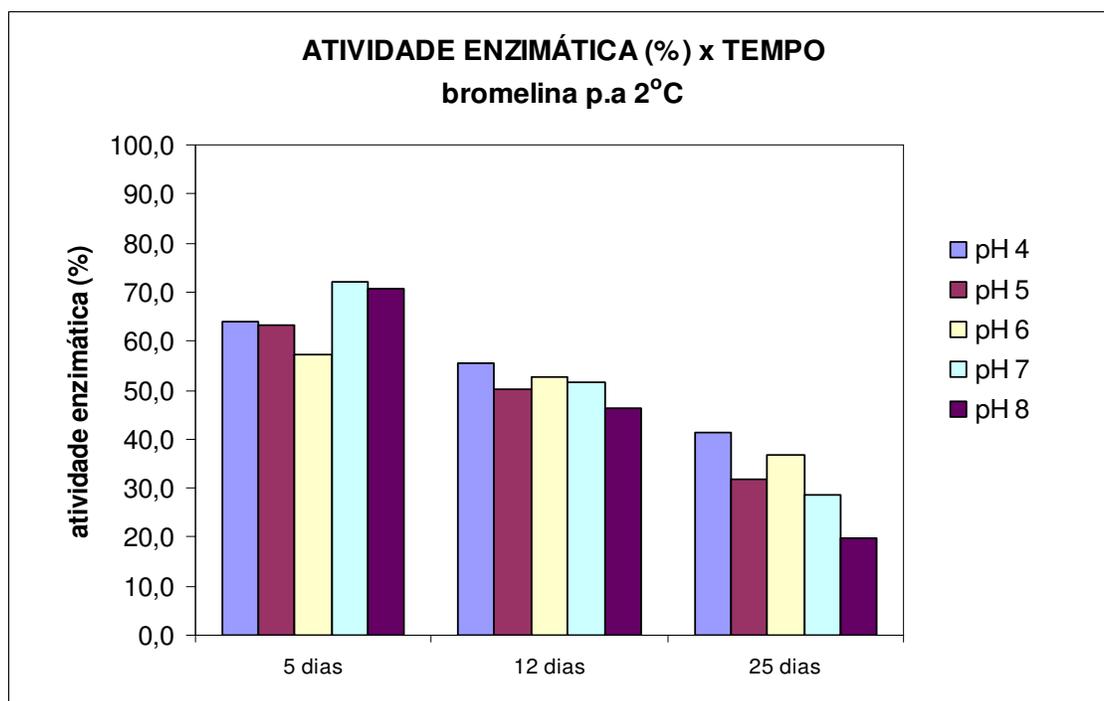


Figura 4.3.2 - Atividade enzimática restante da bromelina p.a. em solução aquosa 0,2% (m/v) armazenada em geladeira ( $T = 2^{\circ} C$ ) em função do tempo.

Após o vigésimo quinto dia de armazenamento a bromelina em solução pH 4 ainda possuía 41,4% de sua atividade enzimática. Em pH 5, 6, 7 e 8 a atividade enzimática após este período era de 31,8%, 36,8%, 28,5% e 19,7% respectivamente.

Nas primeiras duas semanas de estudo a porcentagem de perda de atividade enzimática não foi significativamente diferente entre as soluções, entretanto acentuou-se após este período até o vigésimo quinto dia.

A continuação da determinação da atividade enzimática não seria mais relevante após o período estudado, já que em todos os pHs a perda ultrapassava os 50% de atividade proteolítica.

#### **4.4. Atividade enzimática da bromelina da polpa do abacaxi Pérola em função do tempo para diferentes valores de pH**

Visto que a maior diferença inicial de atividades proteolíticas e de porcentagem de perda estava entre os extremos de pH estudados, resolveu-se avaliar o comportamento da bromelina presente na polpa do abacaxi Pérola nestas mesmas condições de pH e temperatura (pH 4 e 8, temperatura 2°C) a fim de avaliar a reprodução dos resultados, ou seja, um comportamento semelhante entre a bromelina p.a em solução e a bromelina presente na polpa do abacaxi Pérola.

O comportamento da bromelina presente na polpa do abacaxi foi semelhante ao da bromelina p.a. A atividade inicial da bromelina em pH 4 é maior que em pH 8 e a queda de atividade proteolítica com o passar dos dias é maior em pH 8 que em pH 4. Após vinte e dois dias de armazenamento em geladeira, a enzima(s) presente(s) na polpa do abacaxi com pH 4 havia perdido apenas 2,4% de sua atividade inicial, enquanto em pH 8 a(s) enzima(s) havia perdido 21,8% de sua atividade.

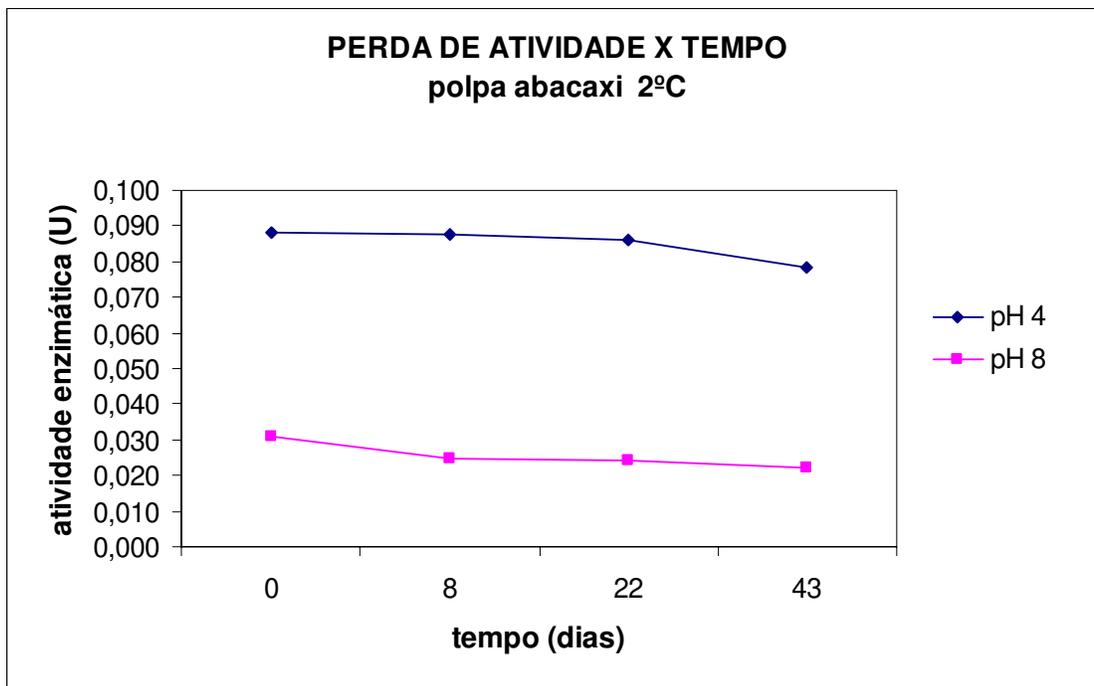


Figura 4.4.1 - Atividade enzimática da bromelina presente na polpa do abacaxi Pérola armazenada em geladeira ( $T = 2^{\circ} C$ ) em função do tempo.

O gráfico abaixo mostra a atividade enzimática restante da bromelina presente na polpa do abacaxi Pérola após armazenamento em geladeira ( $T = 2^{\circ} C$ ) durante o período estudado.

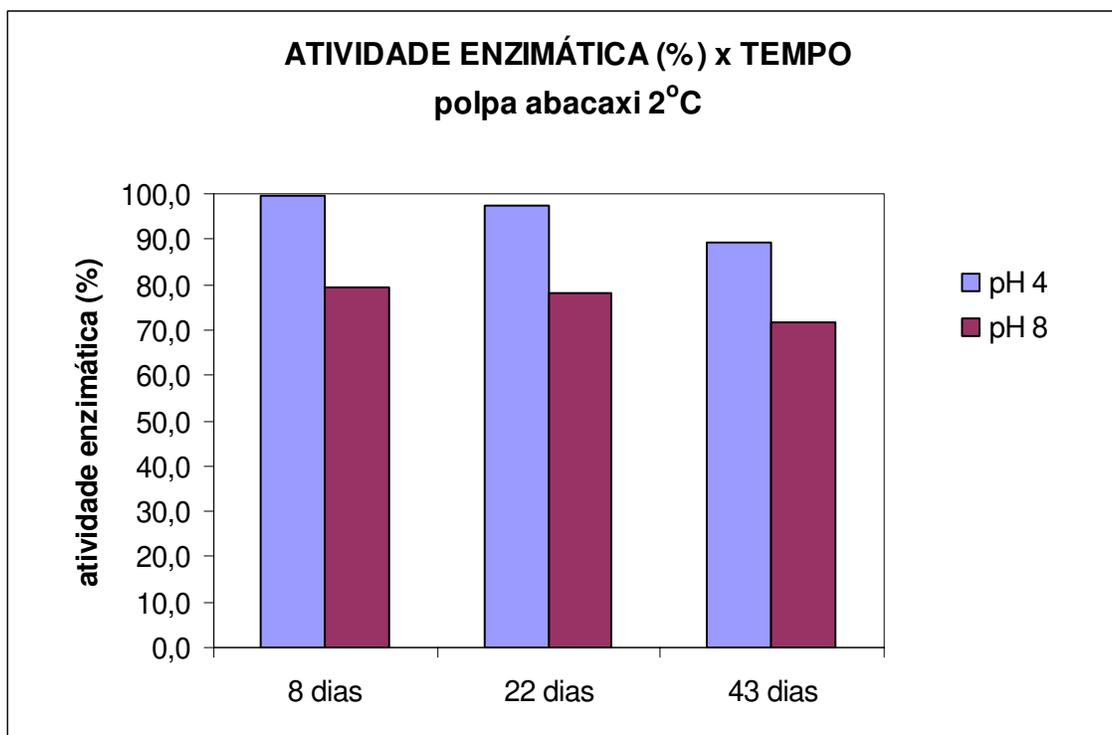


Figura 4.4.2 - Atividade enzimática restante da bromelina presente na polpa do abacaxi Pérola armazenada em geladeira ( $T = 2^{\circ} C$ ) em função do tempo.

Após 43 dias em geladeira a bromelina presente na polpa do abacaxi quando em pH 4 ainda possuía 89,2% de sua atividade enzimática e em pH 8, 71,8%. Da mesma forma que a solução de bromelina p.a., a enzima presente no extrato da fruta, perde sua atividade mais rapidamente em pH 8 do que em pH 4.

Também comparativamente à solução de bromelina p.a., no mesmo pH (por exemplo, 4), a perda de atividade da enzima na polpa da fruta é menor: 10,8 % após 43 dias para bromelina da polpa contra 58,6% para solução de bromelina p.a. após 25 dias.

#### 4.5. Atividade enzimática da bromelina p.a. em solução em função da temperatura

A temperatura de armazenamento ou de exposição de uma enzima também é um fator de extrema importância para a manutenção de sua atividade catalítica, já que o calor é um agente desnaturante. Assim como o pH, a temperatura pode ser um fator de desnaturação protéica e conseqüentemente de perda de atividade enzimática. Como o propósito deste estudo é de avaliar as condições de pH e temperatura que favorecem a estabilidade enzimática da bromelina em solução, sua atividade proteolítica em pH 4 e 8 foi também determinada nas temperaturas de 2 °C, 25 °C, 35 °C, 45 °C e 55 °C.

Dos resultados obtidos verificou-se que a perda de atividade enzimática da solução de bromelina p.a. em pH 4 é significativamente menor do que em pH 8. A 35 °C, a bromelina em pH 4 perde apenas 13,7% de sua atividade, enquanto em pH 8, perde 33,9% da atividade proteolítica.

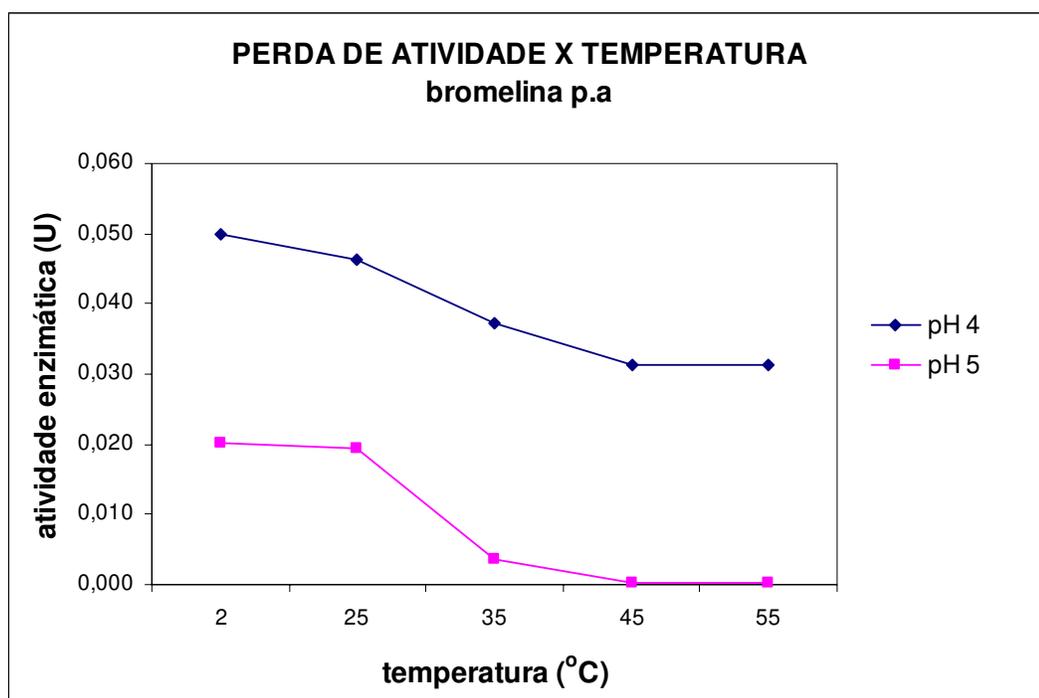


Figura 4.5.1 - Atividade enzimática da solução de bromelina p.a. em pH 4 e 8 em função da temperatura.

Na Figura 4.4.2 abaixo é possível verificar que quando submetida à temperatura de 55 °C, a bromelina em pH 8 é praticamente desnaturada, ou seja,

perde toda sua atividade enzimática, enquanto em pH 4 nesta temperatura a bromelina ainda possui 62,7% de sua atividade.

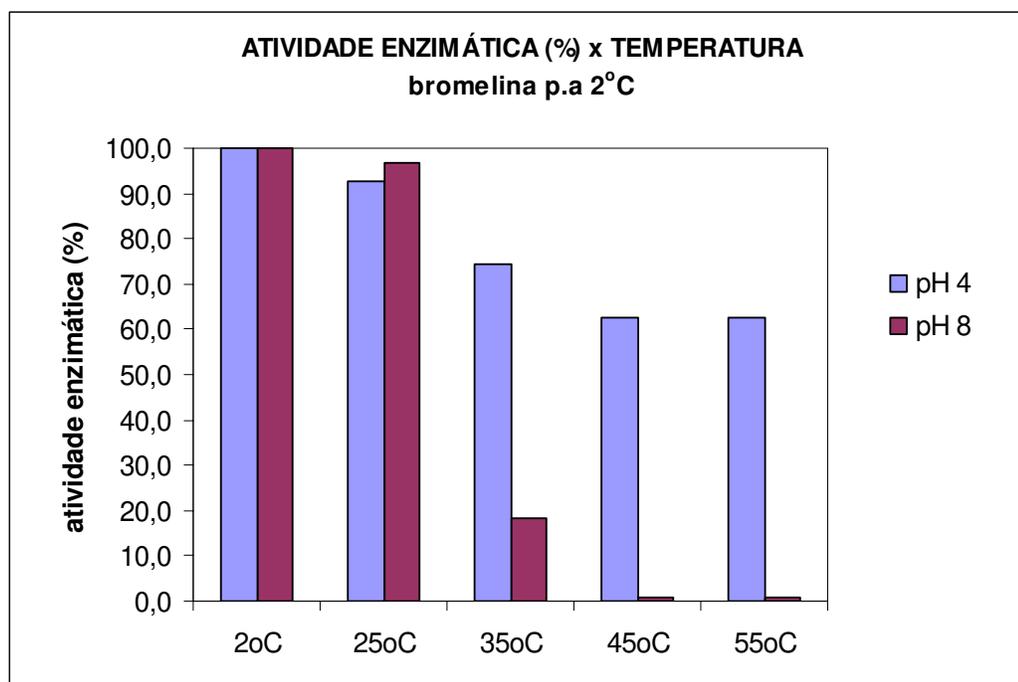


Figura 4.5.2 - Atividade enzimática restante da bromelina p.a. em solução em função da temperatura.

Apesar de a exposição a altas temperaturas ser um fator de desnaturação para uma variedade grande de enzimas, no caso da bromelina foi possível verificar que a exposição a pHs mais alcalinos potencializa este efeito da temperatura. Por exemplo, é possível a exposição da solução de bromelina p.a. em pH 4 a uma temperatura de 55° C sem que ocorra desnaturação total da enzima, enquanto o mesmo não ocorre quando esta se encontra em pH 8.

## 5. Conclusões

Este trabalho teve como objetivo determinar as condições de pH e temperatura mais próximas da ideal, nas quais a Bromelina P.A em solução aquosa em concentração próxima ao do suco extraído da polpa da fruta, mantém-se ativa, ou seja, não desnaturada. A atividade enzimática foi determinada através da hidrólise da caseína segundo modificações das metodologias propostas por KUNITZ, 1947 e WALTER, 1984.

Como explicitado neste trabalho, a bromelina tem sido cada vez mais estudada em virtude das aplicações variadas e das vantagens em relação a outras enzimas. Suas inúmeras propriedades terapêuticas tornam-na de grande potencial para a indústria farmacêutica, uma das indústrias que mais investe em tecnologia. Apesar desta larga aplicação e eficiência dessa enzima, a revisão bibliográfica deste estudo pôde constatar uma literatura ainda incipiente quanto aos métodos e condições de armazenamento da bromelina, sem considerável perda de sua atividade catalítica. Este estudo busca contribuir na construção de um conhecimento mais preciso e prático acerca das condições de estabilidade desta enzima.

Concluiu-se que preparações de solução de Bromelina P.A com pH mais próximo de 4, apresentaram-se mais estáveis tanto em relação ao tempo de armazenamento quanto à temperatura de exposição. Quanto mais próximo do pH 8, mais susceptível à desnaturação ficou a bromelina, ou seja, menor a sua estabilidade enzimática.

Temperaturas altas, acima de 45° C desnaturam rapidamente a Bromelina P.A em solução a pH 8, anulando toda a sua atividade enzimática, já quando em pH 4 mais de 50% da atividade catalítica é mantida quando a solução da enzima é exposta à temperatura de 55° C.

Após realização deste estudo é possível concluir que soluções de Bromelina P.A podem ser preparadas anteriormente ao seu uso, mantendo-se relativamente estáveis por certo período, desde que armazenadas sob condições adequadas de pH e temperatura que não favoreçam a desnaturação (inclusive pela autodigestão da protease).

Por fim, os resultados obtidos por meio deste trabalho de pesquisa contemplaram os objetivos teóricos e práticos, propostos inicialmente a este estudo. O conhecimento destes dados é relevante quando se usa a bromelina seja em procedimentos de análises clínicas ou até mesmo para uso terapêutico, pois permite a otimização das aplicações no que diz respeito a custos e tempo de análise.

## **6. Sugestões para trabalhos futuros**

O estudo da estabilidade enzimática da Bromelina P.A em solução mostrou-se analiticamente viável e de grande importância prática. Uma vez que seria impreciso e inviável o estudo da variação de um grande número de variáveis em função de outras fontes de bromelina ao mesmo tempo, propõe-se como sugestão para novos trabalhos um estudo de estabilidade da bromelina presente na casca do abacaxi, o que seria muito interessante por tratar-se de resíduo da indústria que utiliza a fruta.

Outro estudo interessante seria a comparação da estabilidade enzimática da bromelina do talo, fruto e casca do abacaxi ou ainda a realização de um estudo de estabilidade da bromelina após diferentes métodos de extração.

## **7. Referências Bibliográficas**

ARROYO-REYNA, A.; HERNÁNDEZ-ARANA, A.; *The thermal denaturation of stem bromelain is consistent with an irreversible two-state model*. Biochimica and Biophysica Acta, v. 1248, p. 123-128, 1995.

BALDINI, V.L.S., IADEROZA, M., FERREIRA, E.A.H., SALES, A.M., DRAETTA, I.S., GIACOMELLI, E.J., *Ocorrência da bromelina em espécies e cultivares de abacaxizeiro*. Colet. ITAL, v. 23, n. 1p. 44-55, Campinas, 1993.

BERGMEYER, H.U., *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie, GMBH, Weinheim/Bergstr. Academic Press, New York and London, 1965.

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

BEYNON, R.J., BOND, J.S., *Proteolytic Enzymes – A Practical Approach*, Oxford University Press, 1989.

BICKERSTAFF, G.F., ZHOU, H., *Protease Activity and Autodigestion (Autolysis) Assays Using Coomassie Blue Dye Binding*. Analytical Biochemistry, v.210 p.155-158, 1993.

BRADFORD, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, v.72 p. 248 - 254, 1976.

CAMPESE, G.M., *Extração e Recuperação da Bromelina em Sistemas de Duas Fases Aquosas PEG4000 – POLICAJU*. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia Química, Unicamp, Campinas, 2004.

CÉSAR, A.C.W., *Análise de Viabilidade Econômica de um Processo de Extração e Purificação da Bromelina do Abacaxi*. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia Química, Unicamp, Campinas, 2005.

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

CÉSAR, A.C.W., SILVA, R. e LUCARINI, A.C. *Recuperação das Enzimas Proteolíticas Presentes nas Casca e Talo do Abacaxi*. RIC, 01, 47-54, São Carlos, 1999.

EL-GHARBAWI, M., WHITAKER, J.R. *Fractionation and partial characterization of the proteolytic enzymes of stem bromelain*. Biochemistry, v. 2, n. 3, p. 476-481, 1963.

FOSSUM, K., *Proteolytic enzymes and biological inhibitors-I. Comparasion between the Kunitz Method and agar Gel Casein precipitating reaction for determination of the activity of some Commercial proteolytic enzymes and inhibitors*. Acta Path. Microbiol. Scand., seção B: 78, p. 350-362, 1970.

FREIMAN, L.O., SABAA-SRUR, A.U.O., *Determinação de proteína total e escore de aminoácidos de bromelinas extraídas dos resíduos do abacaxizeiro (Ananás comosus, (L.) Merrill)*. Ciência e tecnologia de alimentos, v.19, n.2, Campinas, 1999.

GIANFREDA, L., SCARFI, M.R., *Enzyme stabilization: state of the art*. Molecular and Cellular Biochemistry , v.100 n.2 p.97-128, 1991.

GUPTA, P., KHAN, R.H., SALEEMUDDIN, M., *Binding of antibromelain monomeric Fab' improves the stability of stem bromelain against inactivation*. Biochimica et Biophysica Acta, 1646, p.131-135, 2003.

HALE, L.P., GREER, P.K., TRINH, C.T., JAMES, C.L., *Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations*. International Immunopharmacology, v.05, p.783-793, 2005.

HAQ, S.K., RASHEEDI, S., KHAN, R.H., *Characterization of a partially folded intermediate of stem bromelain at low pH*. European Journal Biochemistry, v.269, p.47-52, 2002.

HAQ, S.K., RASHEEDI, S., SHARMA, P., AHMAD, B., KHAN, R.H., *Influence of salts and alcohols on the conformation of partially folded intermediate of stem bromelain at low pH*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v.37, n.2, p.361-374, 2005.

KHAN, R.H., RASHEEDI, S., HAQ, S.K., *Effect of pH, temperature and alcohols on the stability of glycosylated and deglycosylated stem bromelain*. J. Biosci. v.28, n.6, p.709-714, 2003.

LEHNINGER, A.L., *Princípios de Bioquímica*, Savier, 1995.

LIANG, H.H., HUANG, H.H., KWOK, K.C., *Properties of tea-polyphenol-complexed bromelain*. Food Research International. v.32, p.545-551, 1999.

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

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

MATULIS, D., WU, C., PHAM, T.V., GUY, C., LOVRIEN, R., *Protection of enzymes by aromatic sulfonates from inactivation by acid and elevated temperatures*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v.7, p.21-36, 1999.

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

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

MORRISON, R.T., BOYD, R.N., *Química Orgânica*, 5ª edição, 1976.

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

PAQUES, F.W., MACEDO, G.A., *Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais*. Química Nova, v.29, n.1, São Paulo, 2006.

PIRES, T.C.R., VEIGA, E.M., FINARDI FILHO, F., *Enzimas Amilolíticas de Mandioquinha-Salsa (Arracacia xanthorrhiza Bancroft)*. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.22, n.3, p.278-284, 2002.

RABELO, A.P.B., TAMBOURGI, E.B., PESSOA JR, A., *Bromelain Partitioning in two-phase aqueous systems containing PEO-PPO-PEO block copolymers*. Journal of Chromatography B, 807, p.61-68, 2004.

RACINE, L.M., *Enzimas em formulações tópicas: bromelina e papaína*, 04/2004.

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

SARTORELLO, M.C., *Estudo do Processo de Extração de Bromelina em Sistema Descontínuo Utilizando Água, Polietileno Glicol e Polissacarídeo da Goma do cajueiro*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química da Unicamp, Campinas, 2004.

SEO, H., ITOYAMA, K., MORIMOTO, K., TAKAGISHI, T., OKA, M., HAYASHI, T., *Spacer effects on enzymatic activity of bromelain immobilized onto porous chitosan beads*. European Polymer Journal, v.34, n.7, p.917-922, 1998.

SUH, H.J., Lee, H.Y. and YANG, H.C. *Purification and characterization of Bromelain isolated from pineapple*. Journal of the Korean Agricultural Chemical Society, v.35, n.4, p.300-7, 1992.

YODOYA, S., TAKAGI, T., KUROTANI, M., HAYASHI, T., FURUTA, M., OKA, M., HAYASHI, T., *Immobilization of bromelain onto porous copoly ( $\gamma$ -methyl-L-glutamate/L-leucine) beads*. European Polymer Journal, v.39, p.173-180, 2003.

## ANEXOS

ANEXO 1 – Curva de calibração de tirosina para determinação da atividade enzimática da bromelina.

<b>Conc. Tirosina (mM)</b>	<b>Absorbância (280nm)</b>
3	0,718
3	0,754
3	0,720
2	0,516
2	0,516
2	0,516
1	0,276
1	0,280
1	0,278
0,5	0,141
0,5	0,142
0,5	0,142
0,25	0,071
0,25	0,086
0,25	0,072

ANEXO 2 - Atividade proteolítica (U) da solução de bromelina p.a. armazenada em geladeira a 2º C

<b>pH</b>	<b>Atividade enzimática (U)</b>			
	<b>0 dia</b>	<b>5 dias</b>	<b>12 dias</b>	<b>25 dias</b>
4	0,053	0,034	0,030	0,022
5	0,055	0,035	0,027	0,017
6	0,052	0,030	0,028	0,019
7	0,045	0,033	0,023	0,013
8	0,042	0,030	0,019	0,008

ANEXO 3 - Perda de atividade enzimática (%) da solução de bromelina p.a. armazenada em geladeira a 2º C

<b>pH</b>	<b>Perda de atividade enzimática (%)</b>			
	<b>0 dia</b>	<b>5 dias</b>	<b>12 dias</b>	<b>25 dias</b>
4	0,0	36,1	44,6	58,6
5	0,0	36,7	50,0	68,2
6	0,0	42,7	47,2	63,2
7	0,0	28,1	48,5	71,5
8	0,0	29,4	53,9	80,3

ANEXO 4 - Atividade proteolítica (U) da bromelina presente na polpa do abacaxi Pérola armazenada em geladeira a 2º C

<b>pH</b>	<b>Atividade enzimática (U)</b>			
	<b>0 dia</b>	<b>8 dias</b>	<b>22 dias</b>	<b>43 dias</b>
4	0,088	0,088	0,086	0,078

8	0,031	0,025	0,024	0,022
---	-------	-------	-------	-------

ANEXO 5 - Perda de atividade enzimática (%) da bromelina presente na polpa do abacaxi Pérola armazenada em geladeira a 2° C

pH	Perda de atividade enzimática (%)			
	0 dia	8 dias	22 dias	43 dias
4	0,0	0,4	2,4	10,8
8	0,0	20,5	21,8	28,2

ANEXO 6 - Atividade proteolítica (U) da solução de bromelina p.a. em diferentes temperaturas

pH	Atividade enzimática (U)				
	2°C	25°C	35°C	45°C	55°C
4	0,050	0,046	0,037	0,031	0,031
8	0,020	0,019	0,004	0,000	0,000

ANEXO 7 - Perda de atividade enzimática (%) da solução de bromelina p.a. em diferentes temperaturas

pH	Perda de atividade enzimática (%)				
	2°C	25°C	35°C	45°C	55°C
4	0,0	7,4	25,5	37,3	37,3
8	0,0	3,3	81,6	99,3	99,3

## APÊNDICE A

### Descrição do método para a determinação da atividade proteolítica através da hidrólise da caseína

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

#### Reagentes:

1. NaOH 1 M: Dissolver 4 g de NaOH em 100 mL de água (destilada ou deionizada).

2. Tampão fosfato 1 M, pH 7,5, dissolver:

a. 34 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  em 250 mL de água.

b. 43,5 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ou 57 g  $\text{K}_3\text{PO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$  em 250 mL de água.

Juntar (b) com (a) e ajustar o pH para 7,5.

3. Ácido clorídrico, HCl 1 M: Adicionar 9,8 mL de HCl (a pelo menos 32%) em 72 mL de água.

4. Preparo do substrato tamponado.

4.1.1 Solução tamponada de caseína (2% m/v; fosfato 0,1 M, pH 7,5):

Suspender 2 g de caseína com cerca de 5 mL de água em um frasco volumétrico, adicionar NaOH (1), cerca de 30 mL de água e mexer bem com agitador magnético até que a caseína esteja completamente dissolvida. Adicionar 5 mL de tampão fosfato (2) para clarear a solução. Ajustar o pH 7,5 com HCl (3) e diluir para 100 mL com água. Solução estável por 1 semana.

5. HCl 0,05 mol/L: Diluir 1 mL da solução (3) com 19 mL de água.

6. Solução estoque de tirosina ( 5 mmol/L): dissolver 45,3 mg de tirosina em 50 mL da solução de HCl (5) - S<sub>0</sub>. Diluir para 3 (P<sub>0</sub>), 2 (P<sub>1</sub>), 1 (P<sub>2</sub>), 0,5 (P<sub>3</sub>) e 0,25 (P<sub>4</sub>) mM com a solução (5). Homogeneizar a solução antes de diluir.

7. Ácido tricloroacético (TCA) 0,3 mol/L: Dissolver 4,9 g de TCA em 100 mL de água (ou diluir 30 mL de TCA 15% para 90 mL).

8. NaOH 0,5 mol/L: Diluir 50 mL da solução (1) em 50 mL de água.

### Procedimento

Pipetar em tubos de centrífuga separados: 2,5 mL de solução de substrato (4.1) nos tubos T e B<sub>3</sub>, 2,5 mL de solução de HCl (5) em B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> e 2,5 mL de cada solução padrão de tirosina (6) (Padrões - P<sub>0</sub>, P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub>).

Deixar em banho por 3 a 5 minutos em temperatura de 37°C.

Adicionar 0,2 mL da amostra (enzima) aos tubos T e B<sub>1</sub>, e 0,2 mL de HCl 0,05 M (5) aos demais.

Misturar e deixar incubando por 10 minutos a 37°C.

Ao fim do tempo adicionar 5 mL de TCA (7a).

Misturar e adicionar 0,2 mL de amostra ao branco.

Deixar em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente.

Remover o precipitado por filtração ou centrifugação por 20 minutos a 2300 g.

### Medida da Atividade

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

- Absorbância da amostra: A<sub>T</sub>
- Absorbância do branco B<sub>1</sub>: A<sub>B1</sub>
- Absorbância do branco B<sub>3</sub>: A<sub>B3</sub>
- Através de A<sub>T</sub> - A<sub>B1</sub> - A<sub>B3</sub>, encontra-se, na curva de calibração, a concentração de tirosina, C<sub>tir</sub>, produzida pela ação da protease presente em 0,2 mL de amostra em 10 minutos a 37°C.

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

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