



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

Área de Concentração: Sistemas de Processos Químicos e Informática

**DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ATIVIDADE ÓTIMA, DA
ESTABILIDADE TÉRMICA E DA CINÉTICA DA HIDRÓLISE
ENZIMÁTICA DE BROMELINA PRESENTE NA CASCA E NO TALO
DO ABACAXI (*Ananas comosus* L. Merrill) VARIEDADE PÉROLA.**

Tese apresentada a Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Autor: Professor Moacyr Jorge Elias

Engenheiro Químico (Escola de Engenharia Mauá, 1975).

Mestre em Engenharia Química (Escola Politécnica da USP, 1983).

Orientador: Professor Doutor Elias Basile Tambourgi

Campinas, 05 de fevereiro de 2010

São Paulo

UNIDADE BC
Nº CHAMADA
T/UNICAMP EL42d
V
TOMBO DC/ 85073
PROC 16-134-10
C D X
PREÇO 11,00
DATA 10/03/10
CÓD T 479671

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

EL42d Elias, Moacyr Jorge ✓
Determinação das condições de atividade ótima, da estabilidade térmica e da cinética da hidrólise de bromelina presente na casca e no talo do abacaxi (Ananas comosus L. Merrill) variedade pérola / Moacyr Jorge Elias. --Campinas, SP: [s.n.], 2010.

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

1. Biotecnologia. 2. Extração líquido-líquido. 3. Proteínas - Purificação. 4. Enzimas. I. Tambourgi, Elias Basile. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Determination of optimum activity conditions, thermal stability kinetic enzymatic hydrolises of bromelain in fruit peel and stem pineapple (Ananas comosus L-Merril) variety perola

Palavras-chave em Inglês: Biotechnonology, Liquid liquid extraction, Protein purification, Enzymes

Área de concentração: Sistemas de Processos Químicos e Informática

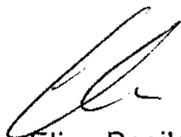
Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora: Adelino Martins Ferreira Gomes, Antonio Carlos Dantas Cal Léo Kunigk, Marcello Nitz da Costa

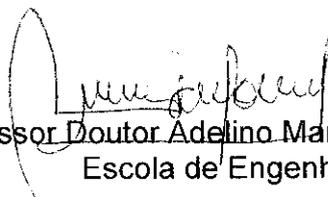
Data da defesa: 05/02/2010

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Tese de Doutorado defendida por Moacyr Jorge Elias e aprovada em 05 de fevereiro de 2010 pela banca examinadora constituída pelos seguintes Doutores:



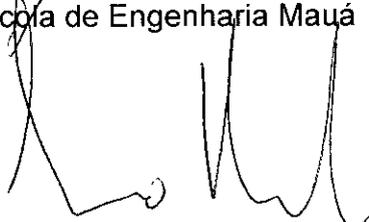
Professor Doutor Elias Basile Tambourgi
Orientador – UNICAMP



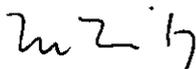
Professor Doutor Adelino Martins Ferreira Gomes
Escola de Engenharia Mauá



Professor Doutor Antonio Carlos Dantas Cabral
Escola de Engenharia Mauá



Professor Doutor Léo Kunigk
Escola de Engenharia Mauá



Professor Doutor Marcello Nitz da Costa
Escola de Engenharia Mauá

606206000

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química defendida por Moacyr Jorge Elias e aprovada pela comissão julgadora em 05 de fevereiro de 2010.



Professor Doutor Elias Basile Tambourgi
Orientador – UNICAMP

em memória de meus pais Moisés e Lezeika
à Marise, Daniel, Juliano e Mariana.

AGRADECIMENTOS

A **Escola de Engenharia Mauá do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia**, por ter disponibilizado os laboratórios da Escola para a realização dos ensaios.

Ao **Professor Doutor Elias Basile Tambourgi** pela orientação na execução do presente trabalho, além da amizade demonstrada em oportunidades diversas.

A **Professora Doutora Antônia Miwa Iguti** pelas sugestões com relação aos aspectos analíticos durante a etapa de execução dos ensaios.

A **Professora Doutora Cynthia Jurkiewicz Kunigk** e a **Professora Doutora Eliana Paula Ribeiro** pelo auxílio na definição do planejamento experimental.

Ao **Professor Doutor José Alberto Domingues Rodrigues** pelos comentários quanto à pertinência do uso do aplicativo Microcal Origin no cálculo da velocidade inicial.

Ao **Professor Doutor José Luiz Fejfar** pelo auxílio com relação a algumas reações envolvendo a química orgânica.

Ao **Professor Edison Paulo De Ros Tríboli** pela ajuda na formatação eletrônica deste trabalho.

Ao **Aluno Ivan Fabian Arcuri**, bolsista de iniciação científica, cuja dedicação e interesse foi de fundamental importância na execução da etapa experimental.

Ao **Técnico Douglas Dalla Justina** pela ajuda em alguns ensaios e no preparo das amostras do abacaxi.

Ao citar as pessoas que colaboraram com o presente trabalho no que tange às suas especialidades cria-se, de certa forma, um vínculo com o conteúdo desenvolvido. Preocupado com esta visão, devo ressaltar que eventuais erros encontrados são da inteira responsabilidade do autor.

RESUMO

A bromelina, enzima presente no abacaxi, hidrolisa ligações peptídicas das proteínas; tem aplicação em diversas áreas envolvendo alimentos, medicina e nutrição animal. No abacaxi a bromelina está presente no talo, na polpa e na casca do fruto. Visando avaliar a bromelina presente no fruto brasileiro *Ananas comosus* L. Merrill, variedade pérola, enfocando seu aproveitamento quando recuperada a partir dos resíduos da industrialização, foram pesquisadas, em comparação com a bromelina pura, condições de pH e temperatura para maior atividade, estabilidade térmica ao longo do tempo em várias temperaturas e a cinética da sua atividade catalítica, empregando caseína como substrato. O extrato foi obtido pela trituração da casca e do talo interno do fruto e a reação de hidrólise, com pH controlado, efetuada em reator com 75 mL de volume útil sob constante agitação. Após a reação foi retirada amostra, adicionada em tubo contendo ácido tricloroacético e centrifugado, analisando a absorbância do sobrenadante. Atividade e a cinética foram expressas em mmol tirosina / L.minuto pela absorbância a 280 nm dos aminoácidos aromáticos gerados na hidrólise da caseína. Foram empregadas três relações enzima / substrato (em massa): 1 / 25, 1 / 50 e 1 / 125 para os ensaios relativos ao planejamento experimental em estrela tendo como ponto central pH em 7,0 e temperatura de 35 °C, os resultados foram tratados fornecendo as equações do modelo e as superfícies de resposta; as equações foram tratadas matematicamente fornecendo gráficos da melhor atividade em função da temperatura; os resultados do planejamento experimental mostraram similaridade entre a bromelina dos resíduos do fruto e a bromelina pura tomada como padrão. Para a estabilidade térmica os ensaios foram efetuados determinando a atividade para a relação 1 / 25 sob temperaturas variando entre 25 °C e 62 °C ao longo de 180 minutos com duas faixas de pH: a de melhor atividade definida no planejamento experimental (5,5 a 6,5) e entre 3,3 e 3,5; os resultados foram tratados analisando o gráfico da atividade em função do tempo mostrando que o modelo de ordem um é adequado para descrever a inativação térmica da enzima e que ela ocorre de maneira mais acentuada na faixa de pH 3,3 a 3,5 com valor do fator de frequência k_0 (minuto⁻¹) $2,5 \times 10^{32}$ vezes maior para o extrato. Os ensaios para determinar a cinética da atividade catalítica da bromelina sobre a caseína foram efetuados a temperatura constante de 35 °C e pH de máxima atividade definido no planejamento experimental para cada uma das três relações enzima / substrato estudadas; foram elaboradas as curvas da concentração de aminoácidos formados ao longo do tempo (zero a 15 minutos) e os resultados tratados calculando a derivada das curvas no tempo zero (velocidade inicial); o modelo de Michaelis – Menten mostrou ser adequado para descrever o mecanismo de hidrólise da caseína pela bromelina e os resultados indicam que os valores da velocidade máxima (V_{max}) e da constante de Michaelis (K_m) são maiores para o extrato dos resíduos do fruto do que para a bromelina pura.

Palavras chave: abacaxi, *ananas comosus* L. Merrill, bromelina, cinética enzimática, decomposição térmica, enzima, planejamento experimental.

ABSTRACT

The bromelain, enzyme found in pineapple, hydrolyses peptide protein bonds; there is application in several areas involving food, medicine and animal nutrition. In pineapple the bromelain is present in the flesh, skin and core of the fruit. Aiming to evaluate the bromelain present in Brazilian fruit *Ananas comosus* L. Merrill, pérola type, focusing its use from industrialization residues recovering, it was searched, comparing with pure bromelain, pH conditions and temperature for higher activity, thermal stability along the time under several temperatures and the kinetics of its catalytic activity, using casein as a substrate. The extract was obtained crushing the skin and core of the fruit and the hydrolysis reaction, with controlled pH, done in a 75 mL net volume reactor under constant stirring. After reaction a sample was taken, added to a tube with tri chloroacetic acid and centrifuged, analyzing the supernatant absorbance. Activity and kinetics were expressed as mmol of tyrosine / L.min from absorbance at 280 nm of aromatic amino acids generated by casein hydrolysis. Three enzyme / substrate ratio were employed (weight basis): 1 / 25, 1 / 50 and 1 / 125 for star type experimental design assays with central point at 7.0 for pH and at 35 °C for temperature, the results were processed giving the model equation and surface responses, the equations were mathematically treated giving graphics of best activity as a function of temperature; the experimental design results showed similarity between bromelain from fruit residues and pure bromelain taken as reference. The assays for thermal stability were carried out by activity determination for 1 / 25 ratio under temperatures varying from 25 °C and 62 °C during 180 minutes for two pH ranges: that for best activity defined from experimental design (5.5 to 6.5) and between 3.3 to 3.5; the results were treated by the analysis of the graphics of activity as a function of time showing that the order one model is adequate to describe the enzyme thermal inactivation and that it is stronger at pH range of 3.3 to 3.5 with values of frequency factor k_0 (minute^{-1}) 2.5×10^{32} times bigger for the extract. The assays to determine the kinetics of bromelain catalytic activity on casein were carried out at constant temperature of 35 °C and pH of maximum activity defined by experimental design for each one of the three studied enzyme / substrate ratio; curves were built for the concentration of formed amino acids along the time (from zero to 15 minutes) and the results treated calculating the curves derivative at time zero (initial rate); the Michaelis – Menten model showed to be adequate to describe the casein hydrolysis mechanism of casein by bromelain and the results indicate that the maximum reaction rate (V_{max}) values and the Michaelis constant (K_m) values are bigger for the fruit residues extract than that for pure bromelain.

Key words: *ananas comosus* L. Merrill, bromelain, enzyme, experimental design, enzymatic kinetics, pineapple, thermal decomposition.

SUMÁRIO

1	<u>Introdução e objetivos</u>	1
2	<u>Revisão bibliográfica</u>	3
2.1	Aplicações.....	9
2.2	Cinética da ação enzimática.....	12
2.3	A ação da bromelina	16
2.4	A ação da bromelina imobilizada	23
2.5	A ação da bromelina na decomposição de polímeros	28
2.6	A ação da bromelina: um mecanismo de três etapas.....	31
2.7	Desativação da bromelina.....	33
3	<u>Materiais e métodos</u>	36
3.1	Meio reacional	36
3.1.1	Aquecimento do meio reacional	38
3.2	Rotina dos ensaios.....	39
3.3	Preparo da dispersão de caseína	40
3.4	Preparo da dispersão de bromelina pura.....	41
3.5	Expressão da atividade enzimática e da velocidade inicial da reação de hidrólise	42
3.6	Ensaio com a bromelina pura	43
3.7	Obtenção do extrato da casca e do talo do abacaxi.....	43
3.7.1	Determinação da quantidade de extrato a ser empregada.....	45
3.7.2	Preparo e ensaios com o extrato	45
3.8	Leitura da absorbância	46
3.8.1	Determinação da curva de calibração	47
3.9	Cálculo da concentração dos aminoácidos aromáticos formados pela hidrólise do substrato	48
3.10	Determinação do branco nos ensaios com bromelina pura	49
3.11	Determinação do branco nos ensaios com extrato	51
3.11.1	Avaliação qualitativa	51
3.11.2	Procedimento para determinação do branco	52
3.12	Cálculos referentes aos ensaios para determinação da atividade e da cinética de hidrólise.....	53
3.12.1	Cálculos para atividade e cinética envolvendo a bromelina pura.....	54
3.12.2	Cálculos para atividade e cinética envolvendo o extrato.....	55

3.13	Planejamento experimental.....	56
3.13.1	Modelo quadrático	57
3.13.2	Tratamento dos resultados do planejamento	59
3.14	Estabilidade térmica da enzima	63
3.14.1	Cinética da decomposição térmica.....	64
3.15	Determinação da cinética da ação enzimática da bromelina.....	67
4	<u>Resultados e discussões</u>	70
4.1	Curvas de calibração	70
4.2	Substâncias presentes na bromelina pura e na caseína, que apresentam leitura a 280 nm.	72
4.3	Planejamento experimental.....	76
4.3.1	Planejamento experimental para bromelina pura.....	76
4.3.1.1	Planejamento experimental para bromelina pura: relação 1 / 25.....	77
4.3.1.2	Planejamento experimental para bromelina pura: relação 1 / 50.....	81
4.3.1.3	Planejamento experimental para bromelina pura: relação 1 / 125.....	85
4.3.1.4	Comparativo entre as relações enzima / substrato para a bromelina pura ...	89
4.3.2	Planejamento experimental para o extrato da casca e do talo do abacaxi.....	93
4.3.2.1	Planejamento experimental para o extrato – base: relação 1 / 25.	96
4.3.2.2	Planejamento experimental para o extrato – base: relação 1 / 50.	100
4.3.2.3	Planejamento experimental para o extrato – base: relação 1 / 125.	104
4.3.2.4	Comparativo entre as relações enzima / substrato para o extrato	108
4.3.3	Comparativo entre os planejamentos experimentais para a bromelina pura e para o extrato do fruto	111
4.4	Estabilidade térmica da enzima	112
4.4.1	Estabilidade térmica da bromelina pura relação 1 / 25: pH conforme o planejamento.....	115
4.4.2	Estabilidade térmica do extrato base relação 1 / 25: pH conforme o planejamento.....	121
4.4.3	Estabilidade térmica da bromelina pura relação 1 / 25: pH entre 3,3 e 3,5.....	124
4.4.4	Estabilidade térmica do extrato base relação 1 / 25: pH entre 3,3 e 3,5.....	129
4.4.5	Comparativo entre os ensaios de estabilidade térmica	134
4.5	Cinética da hidrólise enzimática	136
4.5.1	Cinética da hidrólise para a relação 1 bromelina pura / 25 caseína.....	138
4.5.2	Cinética da hidrólise para a relação 1 bromelina pura / 50 caseína.....	140
4.5.3	Cinética da hidrólise para a relação 1 bromelina pura / 125 caseína	143

4.5.4 Cinética da hidrólise para o extrato: relação base 1 enzima / 25 caseína	145
4.5.5 Cinética da hidrólise para o extrato: relação base 1 enzima / 50 caseína	148
4.5.6 Cinética da hidrólise para o extrato: relação base 1 enzima / 125 caseína.....	151
4.5.7 Comparativo entre as cinéticas da hidrólise para as relações enzima / substrato estudadas.....	153
5 <u>Conclusões</u>	157
5.1 Conclusões com referência aos planejamentos experimentais	157
5.2 Conclusões quanto à estabilidade térmica.....	158
5.3 Conclusões quanto à cinética da hidrólise enzimática	159
6 <u>Sugestões para trabalhos futuros</u>	160
<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	161
<u>APÊNDICE I</u>	171
<u>APÊNDICE II</u>	172
<u>APÊNDICE III</u>	173
<u>APÊNDICE IV</u>	174
<u>APÊNDICE V</u>	175
<u>APÊNDICE VI</u>	176
<u>APÊNDICE VII</u>	177
<u>APÊNDICE VIII</u>	178
<u>APÊNDICE IX</u>	179
<u>APÊNDICE X</u>	180
<u>APÊNDICE XI</u>	181
<u>APÊNDICE XII</u>	182
<u>APÊNDICE XIII</u>	183
<u>APÊNDICE XIV</u>	184
<u>APÊNDICE XV</u>	185

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 – Gráfico de Lineweaver-Burk (equação 2.15).	15
Figura 2.2 – Gráfico conforme o método de Eadie-Hofstee.	19
Figura 2.3 – Gráfico de Lineweaver-Burk para bromelina livre e ligada.	25
Figura 2.4 – Sistema membrana – enzima imobilizada.	26
Figura 2.5 – Velocidade da reação em função da concentração de substrato.	29
Figura 2.6 – Gráfico de Lineweaver-Burk para os dados da Figura 2.5.	29
Figura 2.7 – Gráfico da atividade em função do tempo.	34
Figura 3.1 – Fotografia do reator com o agitador.	37
Figura 3.2 – Fotografia do banho termostático.	37
Figura 3.3 – Fotografia da centrífuga.	39
Figura 3.4 – Fotografia do agitador magnético. No balão, dispersão de caseína.	41
Figura 3.5 – Fotografia da casca (a esquerda) e do talo (a direita) cortados.	44
Figura 3.6 – Fotografia do JUICER MULTIUSO PJE-800S (fabricante PREMIUM) – vista de topo.	44
Figura 3.7 – Fotografia do JUICER MULTIUSO PJE-800S (fabricante PREMIUM) – vista lateral.	45
Figura 3.8 – Fotografia do espectrofotômetro VARIAN modelo CARY 1E.	46
Figura 3.9 – Fotografia da câmara para instalação das cubetas com as amostras. ...	47
Figura 3.10 – Espectro da absorbância dos diversos reagentes utilizados.	49
Figura 3.11 – Espectro da absorbância α do extrato em diversos valores de pH.	52
Figura 3.12 – Planejamento em estrela.	58
Figura 3.13 – Matrizes para o cálculo das constantes da equação (3.14).	60
Figura 3.14 – Matriz b , com os valores das constantes da equação (3.14).	61
Figura 3.15 – Gráfico para verificar o ajuste do modelo quadrático aos resultados experimentais do planejamento.	61
Figura 3.16 – Gráfico para verificação do ajuste ao modelo de primeira ordem na desativação térmica da bromelina.	66
Figura 3.17 – Gráfico para verificação do ajuste ao modelo de Arrhenius da dependência de k_i com a temperatura.	66
Figura 4.1 – Gráfico absorbância em função da concentração de tirosina: primeiros seis ensaios.	71
Figura 4.2 – Gráfico absorbância em função da concentração de tirosina: ensaios complementares.	71
Figura 4.3 – Superfície de resposta para bromelina pura 1 / 25.	77
Figura 4.4 – Projeção da superfície de resposta para bromelina pura 1 / 25.	78
Figura 4.5 – Gráfico comparativo para o modelo bromelina pura relação 1 / 25.	79

Figura 4.6 – Gráfico da atividade para pH ótimo em função da temperatura codificada – bromelina pura 1 / 25.	80
Figura 4.7 – Superfície de resposta para bromelina pura 1 / 50.	81
Figura 4.8 – Projeção da superfície de resposta para bromelina pura 1 / 50.	82
Figura 4.9 – Gráfico comparativo para o modelo bromelina pura relação 1 / 50.	83
Figura 4.10 – Gráfico da atividade para pH ótimo em função da temperatura codificada – bromelina pura 1 / 50.	84
Figura 4.11 – Superfície de resposta para bromelina pura 1 / 125.	85
Figura 4.12 – Projeção da superfície de resposta para bromelina pura 1 / 125.	86
Figura 4.13 – Gráfico comparativo para o modelo bromelina pura relação 1 / 125. ...	87
Figura 4.14 – Gráfico da atividade para pH ótimo em função da temperatura codificada – bromelina pura 1 / 125.	88
Figura 4.15 – Comparativo entre as três relações bromelina pura / caseína.	89
Figura 4.16 – Concentrações ao longo do tempo: estado pseudo-estacionário.	91
Figura 4.17 – Formação de aminoácidos aromáticos na hidrólise da caseína.(bromelina pura 1 / 25; 49 °C e pH 7,0).	92
Figura 4.18 – Comportamento da atividade do extrato com a estocagem.	96
Figura 4.19 – Superfície de resposta para o extrato – base: relação 1 / 25.	97
Figura 4.20 – Projeção da superfície de resposta o extrato – base: relação 1 / 25. ...	97
Figura 4.21 – Gráfico comparativo para o modelo – extrato base relação 1 / 25.	99
Figura 4.22 – Gráfico da atividade para pH ótimo em função da temperatura codificada. Extrato – base: relação 1 / 25.	100
Figura 4.23 – Superfície de resposta para o extrato – base: relação 1 / 50.	101
Figura 4.24 – Projeção da superfície de resposta o extrato – base: relação 1 / 50. ...	101
Figura 4.25 – Gráfico comparativo para o modelo – extrato base relação 1 / 50.	103
Figura 4.26 – Gráfico da atividade para pH ótimo em função da temperatura codificada. Extrato – base: relação 1 / 50.	104
Figura 4.27 – Superfície de resposta para o extrato – base: relação 1 / 125.	105
Figura 4.28 – Projeção da superfície de resposta para o extrato – base: relação 1 / 125.	105
Figura 4.29 – Gráfico comparativo para o modelo – extrato base relação 1 / 125.	107
Figura 4.30 – Gráfico da atividade para pH ótimo em função da temperatura codificada. Extrato – base: relação 1 / 125.	108
Figura 4.31 – Comparativo entre as três relações enzima / caseína, relativas ao extrato.	109
Figura 4.32 – Comparativo entre os planejamentos efetuados para bromelina pura e para o extrato.	111

Figura 4.33 – Gráfico $-\ln\left(\frac{A}{A_0}\right)$ em função de θ para bromelina pura 1 / 25; pH conforme planejamento: primeiro conjunto de ensaios.	117
Figura 4.34 – Gráfico $-\ln\left(\frac{A}{A_0}\right)$ em função de θ para bromelina pura 1 / 25; pH conforme planejamento: segundo conjunto de ensaios.	117
Figura 4.35 – Gráfico de $\ln k_i$ em função de $\frac{1}{T}$ para bromelina pura relação 1 / 25 e pH conforme planejamento.	119
Figura 4.36 – Gráfico de $\frac{1}{A}$ em função do tempo θ para estabilidade térmica da bromelina pura 1 / 25, pH do planejamento, temperatura 62 °C.	120
Figura 4.37 – Gráfico $-\ln\left(\frac{A}{A_0}\right)$ em função de θ para o extrato base 1 / 25 conforme pH do planejamento: primeiro conjunto de ensaios.	123
Figura 4.38 – Gráfico $-\ln\left(\frac{A}{A_0}\right)$ em função de θ para o extrato base 1 / 25 conforme pH do planejamento: segundo conjunto de ensaios.	123
Figura 4.39 – Gráfico $-\ln\left(\frac{A}{A_0}\right)$ em função de θ para bromelina pura 1 / 25 e pH entre 3,3 e 3,5: primeiro conjunto de ensaios.	126
Figura 4.40 – Gráfico $-\ln\left(\frac{A}{A_0}\right)$ em função de θ para bromelina pura 1 / 25 e pH entre 3,3 e 3,5: segundo conjunto de ensaios.	126
Figura 4.41 – Gráfico de $\ln k_i$ em função de $\frac{1}{T}$ para bromelina pura relação 1 / 25 e pH entre 3,3 e 3,5.	128
Figura 4.42 – Gráfico $-\ln\left(\frac{A}{A_0}\right)$ em função de θ para o extrato base 1 / 25 e pH entre 3,3 e 3,5: primeiro conjunto de ensaios.	131
Figura 4.43 – Gráfico $-\ln\left(\frac{A}{A_0}\right)$ em função de θ para o extrato base 1 / 25 e pH entre 3,3 e 3,5: segundo conjunto de ensaios.	132
Figura 4.44 – Gráfico de $\ln k_i$ em função de $\frac{1}{T}$ para o extrato base 1 / 25 e pH entre 3,3 e 3,5.	133
Figura 4.45 – Ação catalítica dos íons H^+ na inativação da enzima pelo mecanismo de hidrólise.	136

Figura 4.46 – Concentração de tirosina em função do tempo para bromelina pura, relação 1 / 25: 1° conjunto de ensaios.	138
Figura 4.47 – Concentração de tirosina em função do tempo para bromelina pura, relação 1 / 25: 2° conjunto de ensaios.	181
Figura 4.48 – Concentração de tirosina em função do tempo para bromelina pura, relação 1 / 25: 3° conjunto de ensaios.	181
Figura 4.49 – Gráfico de $1 / v$ em função de $1 / C_S$ para bromelina pura, relação 1 / 25.	140
Figura 4.50 – Concentração de tirosina em função do tempo para bromelina pura, relação 1 / 50: 1° conjunto de ensaios.	141
Figura 4.51 – Concentração de tirosina em função do tempo para bromelina pura, relação 1 / 50: 2° conjunto de ensaios.	182
Figura 4.52 – Concentração de tirosina em função do tempo para bromelina pura, relação 1 / 50: 3° conjunto de ensaios.	182
Figura 4.53 – Gráfico de $1 / v$ em função de $1 / C_S$ para bromelina pura, relação 1 / 50.	141
Figura 4.54 – Concentração de tirosina em função do tempo para bromelina pura, relação 1 / 125: 1° conjunto de ensaios.	143
Figura 4.55 – Concentração de tirosina em função do tempo para bromelina pura, relação 1 / 125: 2° conjunto de ensaios.	183
Figura 4.56 – Concentração de tirosina em função do tempo para bromelina pura, relação 1 / 125: 3° conjunto de ensaios.	183
Figura 4.57 – Gráfico de $1 / v$ em função de $1 / C_S$ para bromelina pura, relação 1 / 125.	145
Figura 4.58 – Concentração de tirosina em função do tempo para o extrato, relação base 1 / 25: 1° conjunto de ensaios.	146
Figura 4.59 – Concentração de tirosina em função do tempo para o extrato, relação base 1 / 25: 2° conjunto de ensaios.	184
Figura 4.60 – Concentração de tirosina em função do tempo para o extrato, relação base 1 / 25: 3° conjunto de ensaios.	184
Figura 4.61 – Gráfico de $1 / v$ em função de $1 / C_S$ para o extrato, relação base 1 / 25.	147
Figura 4.62 – Concentração de tirosina em função do tempo para o extrato, relação base 1 / 50: 1° conjunto de ensaios.	148
Figura 4.63 – Concentração de tirosina em função do tempo para o extrato, relação base 1 / 50: 2° conjunto de ensaios.	185
Figura 4.64 – Concentração de tirosina em função do tempo para o extrato, relação base 1 / 50: 3° conjunto de ensaios.	185
Figura 4.65 – Gráfico de $1 / v$ em função de $1 / C_S$ para o extrato, relação base 1 / 50.	150

Figura 4.66 – Concentração de tirosina em função do tempo para o extrato, relação base 1 / 125: 1° conjunto de ensaios.	152
Figura 4.67 – Concentração de tirosina em função do tempo para o extrato, relação base 1 / 125: 2° conjunto de ensaios.	152
Figura 4.68 – Gráfico de $1 / v$ em função de $1 / C_S$ para o extrato, relação base 1 / 125.	153

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 – Aminoácidos presentes na bromelina (<i>Ananas comosus</i> L. Merrill)	6
Tabela 2.2 – Parâmetros cinéticos da ananaina e da bromelina.	18
Tabela 2.3 – Parâmetros cinéticos para hidrólise do substrato (L - piroglutamil - L- fenilalanil - L - leucina - p - nitroanilina) em pH 6,5.	20
Tabela 2.4 – Parâmetros cinéticos da hidrólise de substratos pela ação da bromelina.	20
Tabela 2.5 – Parâmetros cinéticos (V_{max} e K_m) para bromelina e bromelina deglicosilada.	21
Tabela 2.6 – Parâmetros de Michaelis K_m e V_{max} em pH 8,0 e 37 °C, para bromelina livre e bromelina imobilizada.	24
Tabela 2.7 – Parâmetros cinéticos da ação da bromelina livre e ligada.	25
Tabela 2.8 – Sistema de enzimas imobilizadas em membranas.	27
Tabela 2.9 – Constantes cinéticas para os sistemas enzimáticos imobilizados.	27
Tabela 2.10 – Cinética da acilação da alfa - quimotripsina pelo p - nitrofenil acetato (25 °C).	31
Tabela 2.11 – Hidrólise do N - acetil - L - triptofano etil ester pela alfa - quimotripsina (25 °C).	32
Tabela 2.12 – Hidrólise do N - acetil - L - fenilalanina amida pela alfa-quimotripsina (25 °C).	32
Tabela 3.1 – Conjunto de ensaios previstos no planejamento.	59
Tabela 3.2 – Referências com relação a matriz X	60
Tabela 3.3 – Coeficientes de regressão para a atividade.	61
Tabela 3.4 – Soma quadrática das fontes de variação.	62
Tabela 3.5 – Valores de concentração de caseína trabalhados.	69
Tabela 4.1 – Primeiro conjunto de ensaios para calibração do espectrofotômetro. ...	173
Tabela 4.2 – Conjunto de ensaios complementares para calibração do espectrofotômetro.	174
Tabela 4.3 – Material detectável a 280 nm presente na bromelina pura.	73
Tabela 4.4 – Resíduo detectável a 280 nm presente na caseína.	74
Tabela 4.5 – Concentração, expressa em tirosina, de resíduos presentes na caseína.	75
Tabela 4.6 – Atividade em função das variáveis codificadas (bromelina pura relação 1 / 25).	175
Tabela 4.7 – Análise de variância - bromelina pura, relação 1 / 25.	78
Tabela 4.8 – Atividade em função das variáveis codificadas (bromelina pura relação 1 / 50).	176
Tabela 4.9 – Análise de variância - bromelina pura, relação 1 / 50.	82

Tabela 4.10 – Atividade em função das variáveis codificadas (bromelina pura: 1 / 125)	177
Tabela 4.11 – Análise de variância - bromelina pura, relação 1 / 125.	86
Tabela 4.12 – Atividade em função das variáveis codificadas (extrato – base relação 1 / 25).	178
Tabela 4.13 – Análise de variância – extrato: base relação 1 / 25.	98
Tabela 4.14 – Atividade em função das variáveis codificadas (extrato – base relação 1 / 50).	179
Tabela 4.15 – Análise de variância – extrato: base relação 1 / 50.	102
Tabela 4.16 – Atividade em função de variáveis codificadas (extrato – base relação 1 / 125).	180
Tabela 4.17 – Análise de variância – extrato: base relação 1 / 125.	106
Tabela 4.18 – Estabilidade térmica: bromelina pura 1 / 25. pH conforme planejamento: primeiro conjunto de ensaios.	115
Tabela 4.19 – Estabilidade térmica: bromelina pura 1 / 25. pH conforme planejamento: segundo conjunto de ensaios.	116
Tabela 4.20 – Valores da constante de inativação k_i para bromelina pura relação 1 / 25 e pH conforme o planejamento experimental.	118
Tabela 4.21 – Valores da energia de ativação e do fator de frequência para bromelina pura, relação 1 / 25 e pH conforme planejamento.	119
Tabela 4.22 – Estabilidade térmica: extrato base 1 / 25. pH conforme planejamento: primeiro conjunto de ensaios.	121
Tabela 4.23 – Estabilidade térmica: extrato base 1 / 25. pH conforme planejamento: segundo conjunto de ensaios.	122
Tabela 4.24 – Estabilidade térmica: bromelina pura 1 / 25. pH entre 3,3 e 3,5: primeiro conjunto de ensaios.	124
Tabela 4.25 – Estabilidade térmica: bromelina pura 1 / 25. pH entre 3,3 e 3,5: segundo conjunto de ensaios.	125
Tabela 4.26 – Valores da constante de inativação k_i para bromelina pura relação 1 / 25 e pH entre 3,3 e 3,5.	127
Tabela 4.27 – Valores da energia de ativação e do fator de frequência para bromelina pura, relação 1 / 25 e pH entre 3,3 e 3,5.	128
Tabela 4.28 – Estabilidade térmica: extrato base 1 / 25. pH entre 3,3 e 3,5: primeiro conjunto de ensaios.	130
Tabela 4.29 – Estabilidade térmica: extrato base 1 / 25. pH entre 3,3 e 3,5: segundo conjunto de ensaios.	131
Tabela 4.30 – Valores da constante de inativação k_i para o extrato base 1 / 25 e pH entre 3,3 e 3,5.	133
Tabela 4.31 – Valores da energia de ativação e do fator de frequência para o extrato base relação 1 / 25 e pH entre 3,3 e 3,5.	134
Tabela 4.32 – Valores intermediários da energia de ativação e do fator de frequência para os ensaios de estabilidade térmica.	134

Tabela 4.33 – Valores de pH utilizados nos ensaios da cinética de hidrólise enzimática.	137
Tabela 4.34 – Velocidade inicial para bromelina pura, relação 1 / 25.	139
Tabela 4.35 – Valores de V_{max} e K_m para bromelina pura, relação 1 / 25.	139
Tabela 4.36 – Velocidade inicial para bromelina pura, relação 1 / 50.	142
Tabela 4.37 – Valores de V_{max} e K_m para bromelina pura, relação 1 / 50.	142
Tabela 4.38 – Velocidade inicial para bromelina pura, relação 1 / 125.	144
Tabela 4.39 – Valores de V_{max} e K_m para bromelina pura, relação 1 / 125.	144
Tabela 4.40 – Velocidade inicial para o extrato, relação base 1 / 25.	146
Tabela 4.41 – Valores de V_{max} e K_m para o extrato, relação base 1 / 25.	148
Tabela 4.42 – Velocidade inicial para o extrato, relação base 1 / 50.	149
Tabela 4.43 – Valores de V_{max} e K_m para o extrato, relação base 1 / 50.	150
Tabela 4.44 – Velocidade inicial para o extrato, relação base 1 / 125.	151
Tabela 4.45 – Atividades calculadas a partir dos ensaios para cinética.	154
Tabela 4.46 – Valores previstos de V_{max} e K_m para o extrato.	156
Tabela 4.47 – Valores de V_{max} e K_m para a bromelina pura.	156

LISTA DE SÍMBOLOS ¹

<i>A</i>	Atividade (mmol / L.min)	Símbolos gregos:	
<i>A₀</i>	Atividade inicial (mmol / L.min)	<i>α</i>	Absorbância
<i>B</i>	Constante da curva de calibração	<i>θ</i>	Tempo (minutos)
<i>C</i>	Concentração (mmol / L)		
<i>D</i>	Constante da curva de calibração	Subscritos:	
<i>E</i>	Enzima	<i>cd</i>	Codificada
<i>E_a</i>	Energia de ativação (kJ / mol)	<i>E</i>	Enzima
<i>ES</i>	Complexo enzima substrato	<i>ES</i>	Complexo enzima substrato
<i>k</i>	Constante de velocidade da reação	<i>E_t</i>	Enzima total
<i>k₀</i>	Fator de frequência (min ⁻¹)	<i>P</i>	Produtos
<i>k_i</i>	Constante de inativação (min ⁻¹)	<i>S</i>	Substrato
<i>K_m</i>	Constante de Michaelis $\left(\frac{mmol}{L}\right)$	<i>tir</i>	Tirosina
<i>L</i>	Litro	Abreviaturas	
<i>M</i>	Molar (mol / litro)	<i>min</i>	Minuto
<i>mL</i>	Mililitro	<i>rpm</i>	Rotação por minuto
<i>P</i>	Produtos	<i>TCA</i>	Ácido tricloroacético
<i>R</i>	Constante $\left(8,3144 \frac{J}{mol K}\right)$		
<i>S</i>	Substrato		
<i>t</i>	Temperatura (°C)		
<i>T</i>	Temperatura (K)		
<i>v</i>	Velocidade inicial $\left(\frac{mmol}{L min}\right)$		
<i>V</i>	Volume (mL)		
<i>V_{max}</i>	Velocidade máxima $\left(\frac{mmol}{L min}\right)$		

¹ No capítulo Revisão bibliográfica manteve-se a simbologia adotada pelos autores em algumas citações

1 Introdução e objetivos

A bromelina tem aplicação em diversas áreas envolvendo industrialização de alimentos e medicina, passando pela indústria de cosméticos, na desodorização de gases e nutrição animal. Na indústria de alimentos pode ser empregada, por exemplo, na hidrólise da miosina produzindo efeito de amaciamento da carne. Na medicina demonstrou-se *in vitro* que a bromelina é capaz de reduzir o crescimento de tumores; pode ser utilizada nos casos de inflamação como, por exemplo, os causados por ferimentos traumáticos. Na área de nutrição animal, a bromelina foi estudada como agente de degradação de proteínas presentes em alimentos destinados a ruminantes.

A bromelina pertence ao grupo de sulfidril proteases, que tem a característica de hidrolisar ligações peptídicas das proteínas. Este grupo de enzimas inclui a papaína, fictina e bromelina. Encontra-se presente no abacaxi (*ananas comosus*) cujas enzimas são referidas de forma genérica como bromelinas. O nome bromelina foi originalmente cunhado para designar qualquer protease de qualquer membro das bromeliáceas.

No abacaxi a bromelina está presente no talo, na polpa e na casca do fruto. A enzima pode ser obtida empregando o processo de extração por micelas reversas em coluna de campânulas pulsantes, ou por precipitação empregando etanol. Estas técnicas já foram objeto de estudos na Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP.

Na sua quase totalidade as publicações consultadas referem-se à cinética da atividade enzimática da bromelina de acordo com o modelo de Michaelis - Menten, que considera a reação reversível entre a enzima e o substrato formando um complexo intermediário, com parte deste complexo gerando produtos e restituindo a enzima. Os trabalhos publicados abordam a ação da bromelina sobre um substrato, e poucos a relacionam com a origem do fruto de onde foi extraída.

O objetivo deste trabalho foi pesquisar o comportamento da enzima bromelina encontrada no abacaxi brasileiro: *ananas comosus* L. Merrill. Para tanto foi utilizada a variedade pérola, adquirida diretamente do mercado. O estudo

concentrou-se na casca e no talo tendo em vista o aproveitamento dos resíduos desta fruta, de onde se pode extrair a bromelina com aplicação a ser direcionada às diversas áreas já citadas (alimentos, medicina e nutrição animal).

Os frutos foram adquiridos diretamente do mercado. O procedimento para obter o extrato da casca e do talo obedeceu à seqüência: lavagem dos frutos, separação da casca e do talo, corte em pedaços pequenos e trituração. O extrato foi recolhido, acondicionado em garrafas e estocado em *freezer* em temperaturas abaixo de 20 °C negativos. Imediatamente antes dos ensaios, foi descongelado e centrifugado (5000 rpm) por três minutos para separar sólidos em suspensão. Como referência foi empregada bromelina pura (*Fluka pineapple stem*).

Para todos os ensaios realizados o substrato empregado foi a caseína. A quantidade de bromelina pura foi calculada diretamente, a quantidade de extrato obtido do talo e da casca do fruto foi determinada experimentalmente comparando resultados da atividade enzimática, uma vez que não se conhecia a quantidade exata de bromelina presente.

Precedendo a determinação da estabilidade térmica e da cinética da hidrólise elaborou-se um planejamento experimental para cada uma das relações em massa enzima / substrato estudadas: 1 / 25, 1 / 50 e 1 / 125, visando encontrar a condição de pH para melhor atividade. Neste planejamento fixou-se a concentração de enzima e a concentração de substrato, e variou-se a temperatura e o pH. A estabilidade térmica da enzima foi estudada para a relação 1 enzima / 25 substrato em diferentes temperaturas ao longo do tempo, no pH de maior atividade encontrado no planejamento experimental.

Nos ensaios para a cinética da hidrólise foi utilizada a técnica da velocidade inicial de formação de produtos para várias concentrações de substrato mantendo-se a concentração da enzima; o pH foi o de maior atividade mostrada pelo planejamento experimental e a temperatura foi de 35 °C, uma vez que grande parte das publicações consultadas referem-se a temperaturas por volta deste valor.

2 Revisão bibliográfica

A bromelina pode ser obtida das diversas partes do abacaxizeiro. Segundo FREIMAN & SABAA-SRUR (1996), um dos processos, que envolve a precipitação com álcool etílico, pode ser resumido na seqüência: desintegração das partes da planta, filtração, centrifugação (10000 rpm, por 20 minutos a 5 °C) obtendo-se o extrato bruto; precipitação com álcool etílico a 10 °C (proporção 1:1), repouso (por 24 horas a 5 °C), e centrifugação (10000 rpm por 20 minutos a 5 °C), obtendo-se o precipitado final. CESAR (2005) trabalhou na recuperação de praticamente toda bromelina do abacaxi empregando a precipitação em um estágio com etanol a 5 °C.

A precipitação pode ser obtida também com emprego de acetona (DAUD, YUSOFF & RAO, 1990). Como etapa de purificação da enzima, a remoção de açúcares pode ser feita passando o precipitado por uma coluna com resina de troca iônica (TISSEAU, 1986). A purificação pode também ser feita empregando sulfato de amônia com posterior passagem em coluna de troca de cátion (KO B-S, HWANG Y-I & LEE S-C, 1996). A purificação da enzima do *Ananas Comosus* via técnica cromatográfica foi estudada por DEVAKATE et. al. (2009).

A bromelina também foi obtida sem o uso de solvente orgânico (USSR ACADEMY OF SCIENCES; IEVLEVA et al.,1993). Em outro trabalho, obteve-se sua precipitação com o emprego de ácido tânico (HUANG, LIN & LI, 1993). Outra forma de extração da bromelina foi estudada utilizando poli etilenoglicol e fosfato de potássio (MOREIRA, SILVA & CHIAVONE FILHO, 2002). A extração da bromelina por micelas reversas foi estudada por FISCHER (2006), HEMAVATHI, HEBBAR & RAGHAVARAO (2007) e UMESH, SUMANA & RAGHAVARAO (2008)

A bromelina pertence ao grupo de sulfidril proteases, que tem a característica de hidrolisar ligações peptídicas das proteínas. Este grupo de enzimas inclui a papaína, fictina e bromelina. Encontra-se presente no abacaxi (*Ananas comosus*), cujas enzimas são referidas de forma genérica como “bromelinas” (ROWAN, 2004a).

A concordância da seqüência de aminoácidos da bromelina com outras

proteínases mostra, de forma inequívoca, que a enzima é um membro da família da papaína (RITONJA et al., 1989). O nome bromelina foi originalmente cunhado para designar qualquer protease de qualquer membro das *Bromeliaceas*. Segundo ROWAN, BUTTLE & BARRETT (1988), atualmente são reconhecidos dois tipos de bromelina do abacaxi: bromelina da casca e do talo (stem) e bromelina da polpa do fruto, ambas classificadas como EC 3.4.22.4 (IUB Enzyme Nomenclature Committee, 1984, Enzyme Nomenclature, p. 352, Academic Press, New York). Duas formas de bromelina foram isoladas por filtração de gel, estas formas possuem estruturas bem próximas (ARROYO-REYNA, HERNANDEZ-ARANA & ARREGUIN-ESPINOSA, 1994).

A variação estrutural da bromelina (cisteína proteínase) no mecanismo catalítico enzimático revela considerável diferença daquele para a papaína (EC 3.4.22.2). O alinhamento da seqüência de aminoácidos da bromelina difere em três regiões, a principal diferença é a presença de lisina no lugar de serina-176 presentes na papaína (TOPHAM et al., 1990).

A bromelina “crua” é uma mistura de diferentes cisteína proteínases, pertencentes à super família da papaína. A proteína é considerada uma glicoproteína com massa molecular 22828. Cromatografia de troca iônica da bromelina “crua” mostrou seis componentes proteolíticos, caracterizados pela massa molecular, composição de aminoácidos e atividade enzimática. Os dados estruturais da seqüência de aminoácidos constituem forte evidência de que as cisteína proteínases tem ancestral comum (HARRACH et al., 1995; TURK, TURK & TURK, 1997). A planta *Ananas comosus* mostrou ter quatro cisteína proteínases distintas, e mais duas presentes apenas no talo (ROWAN, BUTTLE & BARRETT, 1990).

A bromelina consiste em enzimas proteolíticas que diferem entre si quanto ao pH ótimo da atividade enzimática. Como estão intimamente relacionadas é possível tratá-las como uma entidade única. Substratos suscetíveis à bromelina incluem muitas proteínas comuns, como caseína, gelatina, colágeno, globulinas e fibra muscular (LOTZ-WINTER, 1990).

O efeito de inibidores no sistema enzimático é de fundamental importância

para o estudo da natureza dos sítios ativos de uma enzima, particularmente o componente de ligação. Verificou-se que a ananásina (EC 3.4.22.31), cisteína proteinase presente em pequena quantidade no abacaxi (*Ananas comosus*) é fortemente inibida pela cistatina (presente no ovo da galinha), enquanto que a bromelina do talo (EC 3.4.22.32) é fracamente inibida. Sugere-se que as diferenças de ligação entre o inibidor e o substrato possam ser devido a diferenças na geometria das proteínas. A comparação da seqüência de aminoácidos da bromelina do talo com a estrutura da papaína, membros da mesma família de cisteína protease, mostrou que elas compartilham o mesmo mecanismo catalítico (LEE et al., 1997).

Os inibidores da bromelina do abacaxi inibem a cisteína proteinase de modo competitivo. Verificou-se que os inibidores compartilham similaridades com a ligação dissulfeto com inibidores da tripsina / quimotripsina e não com a super família da cistatina. A similaridade estrutural entre eles sugere que os inibidores da bromelina e os da tripsina / quimotripsina estão envolvidos com um ancestral comum, e diferenciados durante a evolução molecular (HATANO, SAWANO & TANOKURA, 2002).

Oito formas de inibidores da bromelina foram isolados do talo do abacaxi. O principal inibidor da bromelina mostrou ser o resíduo COOH (arginina ou glicina) (HATANO, TANOKURA & TAKAHASHI, 1998). Extrato do talo do abacaxi foi fracionado por cromatografia de permeação de gel. Foram encontradas 12 frações, todas mostrando ação inibitória para bromelina (JOUBERT, TALJAARD & CLARK, 1990).

A bromelina do abacaxizeiro existente no Brasil (*Ananas comosus* L. Merrill) é uma protease encontrada no fruto, talo, caule, folhas e raízes. Esta proteína é uma composição de aminoácidos, como mostra a Tabela 2.1 (FREIMAN & SABAA SRUR, 1999).

A cisteína e a histidina formam, em pH entre 3,5 e 8, um par iônico tiolato-imidazol, essencial para a atividade enzimática (TURK, TURK & TURK, 1997). A cadeia da bromelina apresenta sete cisteínas e, portanto provável, três ligações dissulfeto (ROWAN, 2004b). Tanto a bromelina como a papaína apresentam

apenas um grupo reativo cisteinil por molécula, localizado no centro ativo das enzimas, cuja conformação estrutural é estabilizada por três pontes dissulfeto (RAWEL et al., 1998). Reações com isotiocianatos mostraram que a atividade enzimática da bromelina acontece nos grupos sulfidril (RAWEL, KROLL & SCHROEDER, 1998).

Tabela 2.1 – Aminoácidos presentes na bromelina (*Ananas comosus* L. Merrill).

Aminoácido	Fórmula estrutural	Quantidade no caule (primeira precipitação) (mg / 100 g amostra)
Asparagina		2697
Glutamina		2417
Serina		1091
Histidina		(fora dos limites de detecção)
Glicina		965
Treonina		832
Alanina		1126
Arginina		873

Tabela 2.1 – Aminoácidos presentes na bromelina (*Ananas comosus* L. Merrill).
(continuação)

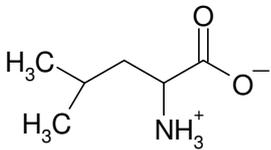
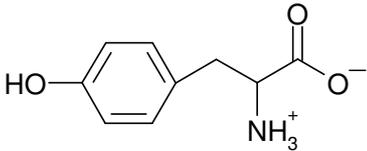
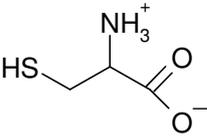
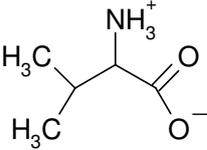
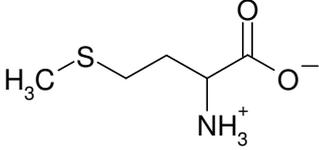
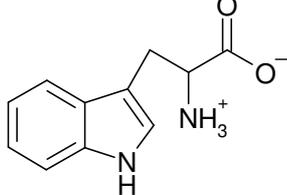
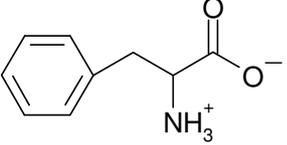
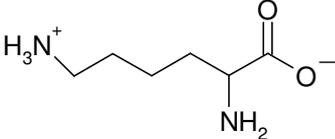
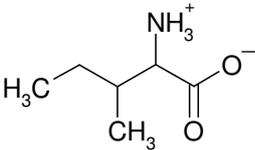
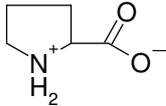
Aminoácido	Fórmula estrutural	Quantidade no caule (primeira precipitação) (mg / 100 g amostra)
Leucina		1013
Tirosina		1218
Cisteína		908
Valina		1197
Metionina		(fora dos limites de detecção)
Triptofano		704
Fenilalanina		661
Lisina		1879

Tabela 2.1 – Aminoácidos presentes na bromelina (*Ananas comosus* L. Merril).
(continuação)

Aminoácido	Fórmula estrutural	Quantidade no caule (primeira precipitação) (mg / 100 g amostra)
Isoleucina		900
Prolina		2148

Fonte: adaptado de FREIMAN & SABAA SRUR (1999) e de MORRISON & BOYD (1983).

O abacaxi (*Ananas comosus* L. Merril) tem origem provável no Paraguai ou Brasil. Das bromelinas, encontradas em diversas partes da planta, apenas aquelas encontradas no fruto (EC 3.4.22.33) e no talo tem sido estudadas. O pH da bromelina do talo (EC 3.4.22.32) difere do pH da polpa do fruto. O ponto isoelétrico da bromelina do talo também difere do ponto isoelétrico da bromelina da fruta. A bromelina do talo é uma glicoproteína, enquanto que a do fruto é desprovida de carboidratos. A enzima presente no fruto é mais ativa com relação à caseína do que a enzima presente no talo (SRIWATANAPONGSE, BALABAN & TEIXEIRA, 2000).

A bromelina do talo tem peso molecular de 23800 Da, composta por uma seqüência de 212 aminoácidos mais açúcar, enquanto que a ananaína tem peso molecular 23464 Da, composta por uma seqüência de 216 aminoácidos (MAURER, 2001).

Fracionamentos do extrato do talo do abacaxi, via cromatografia, produziram seis componentes proteolíticos ativos, todos referidos como “bromelina”. Um fracionamento seguinte mostrou a presença de uma enzima com atividade diferente, chamada ananaína (ROWAN, 2004c).

O significado da bromelina para o abacaxi é um mistério. Uma hipótese baseia-se no fato de que plantas carnívoras obtêm seu suprimento de nitrogênio e fósforo pela decomposição de material orgânico, obtida pela ação de proteinases

altamente ativas e outras enzimas digestivas. Na floresta tropical a planta do abacaxi cresce sobre outras plantas, que oferecem muito pouco alimento. O arranjo das folhas da planta do abacaxi forma um funil que funciona como reservatório, sempre cheio de água da chuva contendo fontes de nitrogênio e fósforo. Esta hipótese é reforçada pela descoberta de que as folhas reagem ao estímulo mecânico produzindo proteinases; com objetivo de digerir as proteínas de insetos e microrganismos foram desenvolvidas famílias de enzimas, como a super família da papaína, com largo espectro de pH ótimo (MAURER, 2001).

2.1 Aplicações

A bromelina tem aplicação em diversas áreas envolvendo industrialização de alimentos e medicina, passando pela indústria de cosméticos quando se considera seu emprego na hidrólise do amido contido no arroz (TECHNOBLE K. K. JAPAN; YAMADA, NAITO & SAWAKI, 1997). Também foi estudada sua utilização na desodorização de gases oriundos de depósitos de lixo (UYAMA SHIZUO; UDA & UYAMA, 1991).

A bromelina, bem como a papaína, pode ser usada para hidrolisar proteínas da carne. Particularmente, a hidrólise da miosina produz efeito de amaciamento da carne uma vez que esta proteína é responsável pelas ligações cruzadas entre as fibras (KIM & TAUB, 1991; FREIMAN DE OLIVEIRA, 2001).

Há interesse na coagulação do leite de soja, cujo objetivo é recuperar as proteínas. A bromelina foi empregada com sucesso para este fim, em substituição ao produto metabólico de microrganismos (MURATA et al., 1987).

As propriedades reológicas da massa destinada à produção de pães podem ser modificadas pelo uso da bromelina em sua formulação. Esta enzima elimina a dependência da capacidade de ligação da água (*water binding capacity*) com o pH (SEGUCHI, HAYASHI & MATSUMOTO, 1997; FREIMAN DE OLIVEIRA, 2001).

O leite, modificado pela adição de bromelina e incubado a 37 °C e 60 °C, apresentou aumento de 11% na digestão de proteínas (QUATTRUCCI et

al.,1991). Este estudo pode indicar uma aplicação para alimentos à base de leite destinados a consumidores especiais.

A bromelina foi empregada na preparação do coalho do leite de soja (KAMATA et al., 1992). Em outro estudo, a farinha de trigo foi adicionada à água e tratada com uma proteinase (bromelina) com objetivo de reduzir a concentração de substâncias que provocam alergia (FOUNDATION FOR SCIENTIFIC TECHNOLOGY PROMOTION; WATANABE, 1997).

Proteínas da soja e do arroz foram hidrolisadas com papaína e bromelina, avaliando-se propriedades como molhabilidade, dispersabilidade, densidade e capacidade de absorção de água (ORTIZ & ANON, 2000; TAHA, IBRAHIM & EL-ZANATY, 2002; TAHA, IBRAHIM & ISMAIL, 2002; TAHA & IBRAHIM, 2002). A proteína contida na parte externa do grão de arroz foi extraída e hidrolisada com 6 % de bromelina, obtendo-se grau de hidrólise de 19 a 36,5 % (APINUNJARUPONG, LAPNIRUN & THEERAKULKAIT, 2009). Bromelinas do abacaxi foram isoladas, purificadas e caracterizadas. As enzimas catalisaram a hidrólise de proteínas como proteína de soja e glúten do trigo (SUH, H.J. et al. 1992). Na área de nutrição animal, a bromelina foi estudada como agente de degradação de proteínas presentes em alimentos destinados a ruminantes (TOMANKOVA & KOPECNY, 1995).

Foi demonstrado (*in vitro*) que a bromelina, devido a sua capacidade proteolítica, é capaz de reduzir o crescimento de tumores (MAURER et al., 1988; HARRACH et al., 1998). A bromelina é empregada nos casos de inflamação associada com edema causado por ferimentos traumáticos ou pós-operatórios (WHITE et al., 1988), inflamações do trato respiratório, inflamações causadas por distúrbios circulatórios (tromboflebite), e também para aumentar a atividade de antibióticos (LOTZ-WINTER, 1990). A bromelina pode ser de interesse para os cirurgiões plásticos devido à sua capacidade de reduzir dor, edema e inflamação, além de potencializar antibióticos, o que pode ser benéfico no pós-operatório (ORSINI, 2006).

Uma revisão refere-se à bromelina como tendo importantes propriedades farmacológicas, como interferência no crescimento de células malignas (TAUSSIG

& BATKIN, 1988) e ação antiinflamatória (HALE et al., 2005; SECOR et. al., 2009). Suas funções biológicas têm valor terapêutico modulando a coagulação do sangue e promovendo a absorção de drogas.

Uma proteína, componente da bromelina, é apresentada com atividade antimicrobiana, imuno estimulante e agente anticâncer (CORTECS UK LTD, MYNOTT, ENGWERDA & PEEK, 1998a). Bromelina, fracionada em múltiplas proteínas pela dissolução em tampão acetato em pH 5,0, apresenta componente responsável pela ativação de células importantes como, por exemplo, células T (CORTECS UK LTD, MYNOTT, ENGWERDA & PEEK, 1998b).

Um estudo efetuado em voluntários sadios e pacientes com desordem no sistema imunológico mostrou que a bromelina estimula as propriedades deste sistema (BRAKEBUSCH et al., 2001). A bromelina do abacaxi serve como auxiliar digestivo na quebra de proteínas (ROXAS, 2008).

A bromelina também é empregada como reagente na análise do sangue (SCOTT, JOHNSON & PHILLIPS, 1987; BOWELL, CULLY & YOUNG, 1988; OGASWARA & MAZDA, 1989; BLOEMBERGEN et al., 1987; TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES & WAKO PURE CHEM IND, SHUKUDA & NAKAJIMA, 1991).

Poli (alfa - aminoácido) e seus copolímeros são biodegradáveis, oferecendo uso potencial como pele artificial temporária na terapia de queimaduras, ou como barreira temporária para evitar adesão de diferentes tecidos danificados em acidentes ou cirurgias. A cadeia destes polímeros pode ser degradada pela bromelina (HAYASHI et al., 1991; HAYASHI et al., 2001), de modo que seu uso pode ser considerado no caso de haver necessidade de acelerar a decomposição destas peles (tecidos) artificiais.

A farmacodinâmica da bromelina é ampla. Com base em experiências *in vitro* e em animais, a bromelina age como preventivo quanto à formação de edemas e metástases. A prevenção contra metástase é explicada pela inibição das moléculas protéicas externas às células, responsáveis pela adesão às paredes do vaso sanguíneo (HARRACH et al., 1994; GARBIN et al., 1994; KLEEF, DELOHERY & BOVBJERG, 1997; MAURER, 2001).

A bromelina também tem aplicação na esterilização de produtos farmacêuticos e alimentícios (RETROSCREEN LTD; SUTTON & OXFORD, 1990). O uso terapêutico da bromelina, papaína e tripsina foi estudado quanto à coagulação do sangue *in vitro*, mostrando que elas interagem de maneiras diferentes (ALBAN, FRANZ & FRANZ, 1997).

Uma combinação de enzimas hidrolíticas, dentre elas a bromelina, mostrou-se efetiva no tratamento de infecções com o vírus da hepatite C. Pacientes com hepatite C tiveram marcada redução nos níveis de transaminases e da carga viral no sangue após 12 semanas de tratamento (MUCOS PHARMA G.M.B.H. UND CO; STAUDER & RANSBERGER, 1999).

2.2 Cinética da ação enzimática

Na sua quase totalidade as publicações consultadas referem-se à cinética da atividade enzimática da bromelina, envolvendo o substrato e a enzima, em um mecanismo como segue:

formação do intermediário:



o intermediário se decompõe no substrato e na enzima (etapa reversível)



o intermediário produz P e restitui a enzima:



onde E , S e P representam enzima, substrato e produto respectivamente, e ES o complexo intermediário formado envolvendo a enzima e o substrato. k_1, k_2 e k_3 são as respectivas constantes de velocidade da reação.

Conforme apresentado por SEGEL (1993) a enzima cumpre o papel de um catalisador, com as seguintes considerações:

A enzima e o substrato reagem rapidamente formando um complexo enzima - substrato.

Enzima, substrato e o complexo enzima - substrato estão em equilíbrio; quer dizer, a velocidade na qual ES se dissocia em $E + S$ é muito maior que a velocidade na qual ES se decompõe para formar $E + P$.

A concentração de substrato é muito maior que a concentração de enzima de modo que a formação do complexo ES não altera a concentração de substrato.

A velocidade global da reação é limitada pela decomposição do complexo ES restituindo a enzima e formando produto (equação 2.3).

A velocidade é medida durante os estágios iniciais da reação.

A velocidade inicial v pode, na prática, ser obtida pela formação de produtos em um intervalo de tempo de ensaio enquanto não mais que 5 % do substrato tiver sido consumido (ou ainda, enquanto a variação da concentração de produtos formados seja linear com o tempo):

$$v = \frac{\Delta C_p}{\Delta \theta} \quad (2.4)$$

onde ΔC_p e $\Delta \theta$ são, respectivamente, variação da concentração de produtos formados e variação do tempo.

Como a velocidade global é limitada pela decomposição do complexo ES em produtos, e restituindo a enzima, pode-se escrever:

$$v = k_3 C_{ES} \quad (2.5)$$

onde C_{ES} é a concentração do complexo enzima - substrato.

A quantidade total de enzima presente no meio reacional é dividida em enzima livre e enzima formando o complexo intermediário:

$$C_{Et} = C_E + C_{ES} \quad (2.6)$$

onde C_{Et} e C_E representam a concentração de enzima total e a concentração de enzima livre, respectivamente.

Dividindo a equação (2.5) pela equação (2.6):

$$\frac{v}{C_{Et}} = \frac{k_3 C_{ES}}{C_E + C_{ES}} \quad (2.7)$$

Considerando um reator de batelada, que é o caso usual em ensaios de laboratório, a velocidade com a qual o complexo intermediário se forma pode ser escrita:

$$\frac{d C_{ES}}{d \theta} = k_1 C_E C_S \quad (2.8)$$

onde C_S representa a concentração de substrato.

A velocidade com a qual o complexo intermediário se decompõe pode ser escrita:

$$-\frac{d C_{ES}}{d \theta} = k_2 C_{ES} + k_3 C_{ES} \quad (2.9)$$

Aplicando o conceito do estado pseudo-estacionário, quer dizer, a velocidade com a qual o complexo intermediário se forma é praticamente igual a velocidade com que ele se decompõe:

$$k_1 C_E C_S = (k_2 + k_3) C_{ES}$$

Rearranjando:

$$C_{ES} = \frac{k_1}{k_2 + k_3} C_E C_S \quad (2.10)$$

Substituindo a equação (2.10) na equação (2.7) e rearranjando:

$$v = \frac{k_3 C_{Et} C_S}{\frac{k_2 + k_3}{k_1} + C_S} \quad (2.11)$$

Da equação (2.10) tem-se:

$$\frac{k_2 + k_3}{k_1} = \frac{C_E C_S}{C_{ES}} = K_m \quad (2.12)$$

onde K_m é a constante de Michaelis. É uma constante de pseudo-equilíbrio que expressa a relação entre as concentrações.

A velocidade máxima da reação é atingida se toda a enzima presente estiver formando complexo intermediário com o substrato, assim:

$$V_{max} = k_3 C_{Et} \quad (2.13)$$

onde V_{max} representa a velocidade máxima.

Substituindo as equações (2.13) e (2.12) na equação (2.11) obtém-se:

$$v = \frac{V_{max} C_S}{K_m + C_S} \quad (2.14)$$

A equação (2.14) representa o modelo de Michaelis - Menten, que descreve o mecanismo de atuação de uma enzima sobre um substrato. FOGLER (2002) apresenta desenvolvimento semelhante, enfocando diretamente o conceito do estado pseudo-estacionário.

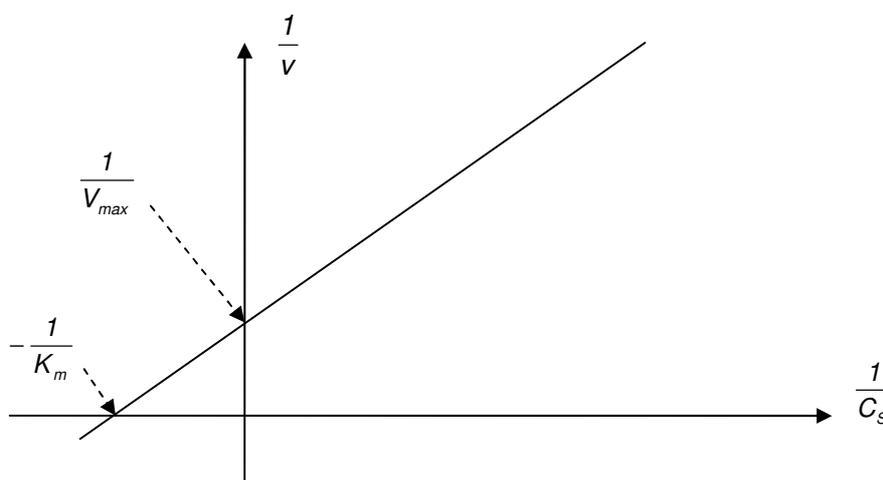


Figura 2.1 – Gráfico de Lineweaver-Burk (equação 2.15).

Para verificar se a ação enzimática da bromelina segue o modelo de Michaelis - Menten, os resultados obtidos nos ensaios devem satisfazer a equação (2.14). Um método muito utilizado é o de Lineweaver - Burk, onde se considera a equação (2.14) invertida:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max} C_S} \quad (2.15)$$

O gráfico da equação (2.15) fornece uma reta onde $\frac{1}{V_{max}}$ é o coeficiente linear e $\frac{K_m}{V_{max}}$ é o coeficiente angular, conforme mostra a Figura 2.1. Se os dados

experimentais atenderem à equação (2.15) admite-se que o modelo proposto (seqüência de reações 2.1, 2.2 e 2.3) é aplicável.

Para casos extremos, a equação (2.14) pode ser simplificada:

– Quando a concentração de substrato é bastante elevada ($C_S \gg K_m$) tem-se que $v \cong V_{max}$. Neste caso o processo simplifica-se para uma reação de ordem zero com relação a C_S .

– Para baixas concentrações de substrato ($C_S \ll K_m$) tem-se que $v \cong \frac{V_{max}}{K_m} C_S$.

Aqui, o processo é simplificado para uma reação de ordem um com relação a C_S .

Ainda com relação à equação (2.14), quando a concentração de substrato ($C_{S1/2}$) é tal que a velocidade da reação corresponde à metade da velocidade máxima :

$$\frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max} C_{S1/2}}{C_{S1/2} + K_m}$$

chega-se a:

$$K_m = C_{S1/2} \quad (2.16)$$

Conhecendo-se a concentração total de enzima adicionada e a velocidade máxima determinada no tratamento dos resultados, pode-se calcular k_3 pela equação (2.13). Entretanto, este valor não é exatamente aquele da equação (2.5) uma vez que parte da enzima está livre. Segundo WHITAKER (1972) é melhor referir-se a esta constante calculada como k_{cat} (constante observada).

2.3 A ação da bromelina

Vários estudos referem-se à ação da bromelina seguindo o modelo de Michaelis - Menten. A bromelina foi purificada a partir do abacaxi coreano via

cromatografia de troca iônica e filtração de gel (Sephadex G-150); a ação enzimática seguiu comportamento típico da cinética de Michaelis - Menten com $V_{max} = 131,58$ mg de caseína por minuto (CHOI et al., 1992). A hidrólise catalisada pela bromelina, tripsina e papaína foi estudada e a velocidade expressa como $\frac{dA}{d\theta}$ a partir de dados de absorvância (A) com o tempo (θ); os resultados foram tratados considerando o modelo de Michaelis - Menten, determinando-se os parâmetros V_{max} e K_m (GIL et al., 1995; GIL et al., 1997). No estudo da atividade de hidrólise da bromelina (purificada da bromelina comercial) sobre o quitosân (β - 1,4 - poli - D - glucosamina) foi encontrado, para K_m , o valor 0,88 mg / mL, em pH = 3 e 50 °C (HUNG et al., 2002). Uma cisteína proteinase foi isolada e purificada a partir das folhas do abacaxi, sua ação sobre substratos sintéticos foi analisada encontrando-se valor de $K_m = 97$ mM. (SINGH, DEVI & DEVI, 2004). Estudando proteinases da família da papaína (incluindo a bromelina), THEODOROU, BIETH & PAPAMICHAEL (2007) sugerem comportamento de acordo com o modelo de Michaelis - Menten.

Foi desenvolvido um método para ensaiar a atividade de proteases (bromelina, quimotripsina e ficina) baseado na medida direta da mudança de turbidez na digestão de proteína de soja, cujos resultados seguiram a equação de Michaelis - Menten (INOUE & NAGAI, 2004).

A diferença entre ananina e bromelina foi estudada empregando o substrato peptídil - 7 - (4 - metil) cumarilamida (ROWAN, BUTTLE & BARRET, 1988). Neste estudo os autores apresentam o comportamento cinético segundo o modelo de Michaelis - Menten. Os valores encontrados para K_m foram da mesma ordem de grandeza, enquanto que os valores de k_{cat} apresentaram diferenças significativas, indicando razoável diferença entre as duas enzimas. A Tabela 2.2 mostra alguns resultados. Neste trabalho, a bromelina foi obtida do talo do abacaxi e purificada via cromatografia; no entanto, não observa a origem do fruto. Para determinação dos parâmetros cinéticos da hidrólise dos substratos da cumarilamida, as medidas das velocidades iniciais de reação foram feitas em solução tampão de fosfato de sódio 0,1 molar (pH 6,8) contendo EDTA 0,001

molar a 40 °C. As enzimas foram ativadas em 0,75 mL do tampão concentrado por 5 minutos, seguindo-se adição de água pré-aquecida e depois o substrato, totalizando um volume de 3 mL.

Tabela 2.2 – Parâmetros cinéticos da ananaina e da bromelina

Proteinase	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})
Ananaina	43,1 a 53,7	6,70 a 7,30
Bromelina	68,9 a 97,3	0,12 a 0,14

Fonte: adaptado de ROWAN, BUTTLE & BARRET (1988).

Em outro trabalho, agora sobre o isolamento e caracterização parcial das proteinases da bromelina (HARRACH et al. 1995), também foram determinados os parâmetros cinéticos da hidrólise. Neste estudo, os autores partiram da bromelina do talo do abacaxi sem, entretanto, citar a origem do fruto. O extrato de bromelina crua foi fracionado por cromatografia, detectando-se oito componentes proteolíticos ativos. Estas frações foram identificadas com códigos de F1 a F9. Os três componentes principais foram F4, F5 e F9, apresentando massas moleculares 24397, 24472 e 23427 respectivamente. Foram observadas algumas diferenças na seqüência de aminoácidos (na posição 10: tirosina no lugar da serina, e na posição 20: asparagina no lugar de glicina). Como substrato, os autores empregaram L - piroglutamil - L - fenilalanil - L - leucina - p - nitroanilina. Meio mililitro de tampão fosfato de sódio (0,1 molar) pH 6,5 contendo 0,3 mol de KCl, 0,1 mmol de EDTA foram misturados com 0,05 mL de dispersão de substrato 0,005 molar, deixando em repouso por 5 minutos a 37 °C. A reação começou com a adição de 0,02 mL de dispersão da amostra. A liberação da nitroanilina foi medida por espectrofotometria (410 nm por 5 minutos). Os autores não discutem modelos cinéticos alternativos, aplicando diretamente o modelo de Michaelis - Menten. Os parâmetros cinéticos da hidrólise do substrato em pH = 6,5 foram determinados com concentração de substrato entre 0,1 e 0,5 milimol e calculados empregando o método de Eadie - Hofstee (WHITAKER, 1972), que consiste em reorganizar a equação 2.14:

$$v = \frac{V_{max} C_S}{K_m + C_S} \quad 2.14$$

multiplicando a equação por $C_S + K_m$:

$$v C_S + v K_m = V_{max} C_S$$

subtraindo $v K_m$:

$$v C_S = V_{max} C_S - v K_m$$

dividindo por C_S :

$$v = V_{max} - \frac{v K_m}{C_S} \quad (2.17)$$

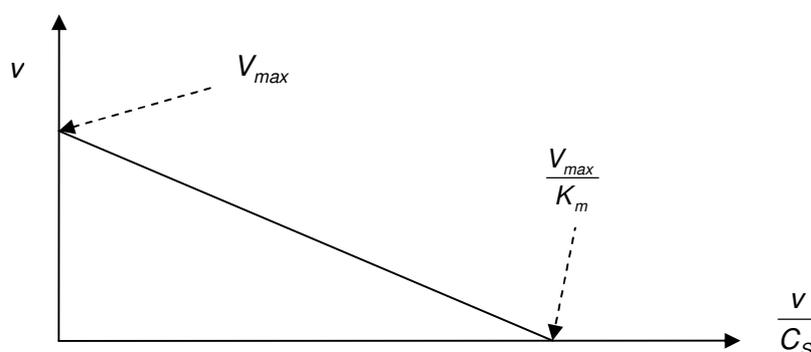


Figura 2.2 – Gráfico conforme o método de Eadie-Hofstee.

A Figura 2.2 mostra um gráfico típico para os resultados tratados conforme o método de Eadie - Hofstee. Este método apresenta a vantagem de um melhor ajuste dos dados a uma reta, na construção do gráfico correspondente. Entretanto, a velocidade v , que é o parâmetro experimental menos preciso, aparece nos dois lados da equação, de modo que a precisão global da determinação de K_m e V_{max} pode ser diminuída. Os valores obtidos encontram-se na Tabela 2.3, para os três componentes proteolíticos principais (F4, F5 e F9).

Observa-se que K_m e k_{cat} são similares para as frações F4 e F5, enquanto que a fração F9 tem K_m seis vezes menor e k_{cat} cinco vezes maior, indicando maior atividade para a fração F9. Esta maior atividade pode ser atribuída à pequena diferença na seqüência de aminoácidos (posição 10: tirosina no lugar da serina, e posição 20: asparagina no lugar da glicina).

Tabela 2.3 – Parâmetros cinéticos para hidrólise do substrato (L - piroglutamil - L - fenilalanil - L - leucina -p - nitroanilina) em pH 6,5.

Proteinase	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	$\frac{k_{cat}}{K_m}$ ($s^{-1} mM^{-1}$)
F4	2,073 a 2,527	0,758 a 0,982	0,38
F5	2,269 a 2,571	0,646 a 0,714	0,28
F9	0,343 a 0,457	3,566 a 4,314	9,75

Fonte: adaptado de HARRACH et al (1995).

A bromelina crua extraída do talo da fruta foi purificada empregando FPLC (*fast protein liquid chromatography*), encontrando-se duas proteinases principais, consideradas duas formas da mesma proteinase (EC 3.4.22.32), chamadas de SBA / a (*stem bromelain acidic proteinase form a*) e SBA / b (*stem bromelain acidic proteinase form b*). A caracterização destas enzimas envolveu o estudo da cinética de sua atuação sobre proteínas. Os substratos empregados foram peptidil 7 - (4 - metil) cumarilamida, em solução tampão de fosfato (pH 6,0) a 25 °C. Neste trabalho (HARRACH, 1998) os autores admitem o modelo de Michaelis - Menten para representar a atuação enzimática da bromelina.

Tabela 2.4 – Parâmetros cinéticos da hidrólise de substratos pela ação da bromelina.

substrato	SBA / a		SBA / b	
	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})
A	7,36 a 8,84	0,0233 a 0,0247	6,2 a 8,6	0,0383 a 0,0417
B	50,2 a 60,6	0,47 a 0,51	43,7 a 83,5	0,435 a 0,685
C	3,22 a 4,58	4,71 a 5,49	2,71 a 3,29	6,204 a 6,596

A. Benziloxicarbinol - arginina - arginina - NH - 7 - (4 - metil) cumarilamida.

B. Benziloxicarbinol -fenilalanina - arginina - NH - 7 - (4 - metil) cumarilamida.

C. Benzoil - fenilalanina - valina - arginina - NH - 7 - (4 - metil) cumarilamida.

Fonte: adaptado de HARRACH et al (1998).

A Tabela 2.4 mostra os resultados encontrados para k_{cat} e K_m após tratamento estatístico adequado. O valor de k_{cat} foi calculado a partir da V_{max} correspondente. Interessante observar que k_{cat} e K_m são semelhantes para SBA / a e SBA / b quando trata-se do mesmo substrato. Entretanto, variam

consideravelmente de substrato para substrato. Neste trabalho os autores não identificam a origem do fruto do qual extraiu-se a bromelina.

De modo a elucidar o papel da glicose presente em moléculas de proteínas, a bromelina do talo (EC 3.4.22.32) do *ananas comosus* foi empregada como modelo (KHAN, RASHEEDI, & HAQ, 2003). Esta enzima é uma tiol protease; uma glicoenzima com peso molecular de 23800 que inclui um oligossacarídeo ligado à asparagina. Para este estudo, a bromelina deglicosilada foi obtida por oxidação com periodato. A bromelina foi obtida da Sigma Chemical Company; não há informação sobre a origem do fruto de onde foi extraída. A pureza foi verificada passando-a por uma coluna com Seralose - 6B, equilibrada com tampão citrato - fosfato e pH 6,0, observando-se apenas um pico de saída. A bromelina (1 mg / mL) foi deglicosilada em solução tampão 0,1 molar de fosfato de sódio (pH 7,0) com solução 10 mM de periodato de sódio, na relação molar 5:1. A reação aconteceu no escuro por 15 minutos, na temperatura ambiente. O processo de oxidação foi interrompido pela adição de 0,25 mL de etileno glicol por mililitro de amostra. A atividade proteolítica foi medida empregando caseína como substrato, e enzima na concentração de 0,1 mg / mL. Caseína foi tratada com dispersão da enzima em pH 7,0 a 37 °C, por 15 minutos. A reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético a 5%. O material precipitado foi removido por centrifugação, e a fração solúvel no ácido tricloroacético foi ensaiada. Os dados experimentais foram tratados e os resultados encontram-se na Tabela 2.5.

Tabela 2.5 – Parâmetros cinéticos (V_{max} e K_m) para bromelina e bromelina deglicosilada.

	V_{max} ($\times 10^{-3}$ mM / minuto)	K_m (mM)
Bromelina glicosilada	1,143 a 1,283	0,13 a 0,15
Bromelina deglicosilada	0,603 a 0,703	0,16 a 0,18

Fonte: adaptado de KHAN, RASHEEDI, & HAQ, (2003).

Da Tabela 2.5 observa-se que V_{max} para a bromelina é aproximadamente o dobro de V_{max} para bromelina deglicosilada, enquanto que os valores de K_m são similares. Estes dois dados, analisados em conjunto, sugerem que os sítios de ligação do substrato não devem ter sido alterados, e que a atividade catalítica pode ter sido alterada devido a efeitos de geometria da molécula. Neste estudo, os

valores obtidos sugerem que o papel do carboidrato é o de estabilizar a enzima. A bromelina é mais estável frente a variações do pH e temperatura do que a sua forma deglicosilada. O carboidrato contribui para a estabilidade da enzima, tornando-a mais resistente a diferentes desnaturantes.

Em um estudo sobre a desnaturação da bromelina também é sugerido que o papel do carboidrato é estabilizar a enzima (RASHEEDI, HAQ & KHAN, 2003).

Poli fenóis extraídos do chá verde chinês foram utilizados para complexar e separar a bromelina do suco do fruto. A característica benéfica do chá para a saúde é atribuída à sua atividade antioxidante e sua interação com as biomoléculas (incluindo proteínas e enzimas). Algumas enzimas e proteínas são desnaturadas pelos poli fenóis contidos no chá. Entretanto, a forte atividade antioxidante e a propriedade de complexar proteínas podem ajudar a estabilizar alguns grupos sulfidril encontrados em proteases como a bromelina e a papaína, as quais tendem a perder atividade à temperatura ambiente devido à oxidação. Neste trabalho (LIANG, HUANG & KWOK, 2000), poli fenóis extraídos do chá verde chinês foram usados para complexar e separar a bromelina do suco do fruto, determinando-se as propriedades da bromelina livre e da bromelina complexada. Os compostos poli fenólicos foram extraídos do chá empregando água quente (95 °C) durante 30 minutos. Após filtração, o extrato foi concentrado por evaporação até aproximadamente 40% de sólidos. A cafeína foi extraída pela adição de clorofórmio. A solução aquosa foi tratada com acetato acético para extrair os poli fenóis. O suco do fruto foi concentrado quatro vezes empregando membrana de poli sulfona. O suco concentrado (atividade de bromelina de aproximadamente 1750 unidades / mL) foi estocado a 4 °C até o uso. O extrato de poli fenóis foi adicionado no suco de abacaxi concentrado, a mistura mantida em banho a 25 °C sob agitação durante 30 minutos, resfriado, e mantido a 4 °C por 2 horas para formar o precipitado da bromelina complexada com os poli fenóis. O precipitado foi separado por centrifugação. As atividades da bromelina livre e bromelina complexada foram ensaiadas em concentrações diferentes de caseína. A máxima recuperação da atividade da bromelina foi encontrada com adição de 0,5 grama de poli fenóis em 100 mililitros de suco concentrado do fruto. A interação entre a enzima e os poli fenóis é atribuída à prolina, aminoácido

constituente da molécula da bromelina. Os resultados da ação enzimática sobre a caseína foram tratados admitindo o modelo de Michaelis - Menten (equação 2.14). Os coeficientes de correlação encontrados ficaram acima de 0,978, indicando que o modelo é aplicável. Os resultados para K_m (mol / L) foram de $8,06 \times 10^{-6}$ para a bromelina livre, e de $1,42 \times 10^{-5}$ para a bromelina complexada com poli fenóis. Ensaio com níveis maiores de poli fenóis mostraram que V_{max} permanece inalterado, indicando que os poli fenóis exibem inibição competitiva com o substrato. A bromelina complexada apresentou maior estabilidade a 60 °C. A faixa ótima de trabalho para o pH foi reduzida de 6,8 a 9,0 para em torno de 7,8. Também neste trabalho, os autores não citam a origem do fruto do qual extraíram a bromelina.

2.4 A ação da bromelina imobilizada

Foram efetuados estudos com relação à ação da bromelina imobilizada em quitosana pelo glutaraldeído (CHEN et al., 1988); imobilizada em celulose empregando CNBr ou glutaraldeído (JASIM et al., 1987); imobilizadas em polivinil álcool por ligação covalente (HAYASHI et al., 1993). Foi estudada também a atividade da bromelina imobilizada covalentemente no quitosana, empregando cadeias espaçadoras (alquiladas) (SEO et al., 1998).

GUPTA & SALEEMUDDIN (2006) imobilizaram a bromelina em Sepharose (fase estacionária) e verificaram, em ensaios com caseína, que a velocidade máxima não foi afetada pela imobilização. Em outro estudo, GUPTA, MAQBOOL & SALEEMUDDIN (2007) imobilizaram a enzima em uma fase estacionária usando como ligante a histidina, presente na bromelina, encontrando para a velocidade máxima valores comparáveis com a enzima livre, após ensaios com caseína.

Bromelina fixada em pequenas esferas porosas de quitosana (oligômero da glucosamina) é interessante, pois permite maior facilidade na sua recuperação para novas utilizações (HAYASHI & IKADA, 1991). Nestas condições, foram efetuadas reações de hidrólise enzimática. O substrato empregado foi N - benzil - L - arginina etil éster. As velocidades de reação foram determinadas em

concentrações de substrato variando de 1 a 10 milimolar, com concentração de enzima em $8,0 \times 10^{-7}$ mol / L. Para os ensaios, o pH foi de 8,0 e a temperatura de 37 °C. A Tabela 2.6 mostra os resultados encontrados. As diferenças observadas, que não são muito elevadas, podem ser atribuídas a efeitos de difusão. Além disso, o efeito devido à ligação covalente da enzima sobre o chitosan, pode contribuir para redução na velocidade. Neste trabalho não é citado o fruto originário da bromelina; ela foi adquirida da Sigma Chem. Co. Os autores admitem o modelo de Michaelis - Menten para o tratamento dos dados cinéticos da ação da bromelina, não discutindo se um modelo alternativo seria mais adequado. O artigo apresenta o gráfico de Lineweaver - Burk para a papaína, estudada em paralelo com a bromelina.

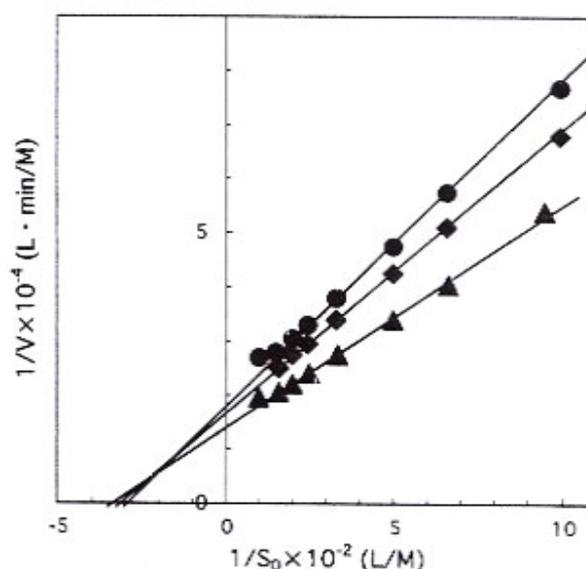
Tabela 2.6 – Parâmetros de Michaelis K_m e V_{max} em pH 8,0 e 37 °C, para bromelina livre e bromelina imobilizada.

Amostra	K_m (mol / L)	V_{max} (mol / L.minuto)
Bromelina livre	$11,2 \times 10^{-2}$	$2,4 \times 10^{-5}$
Bromelina imobilizada	$7,8 \times 10^{-2}$	$1,8 \times 10^{-5}$

Fonte: adaptado de HAYASHI & IKADA (1991)

Dentro da mesma linha de trabalho, outros autores imobilizaram a bromelina em esferas porosas de copolí (γ - metil - L - glutamato / L - leucina) com estreita distribuição de tamanho de poro em torno de 0,5 microns, proporcionando elevada área superficial por unidade de massa (YODOYA et al., 2003). Neste estudo, os copolipeptídeos foram sintetizados e precipitados em metanol com HCl a 4 °C. O produto foi lavado com metanol puro e secado. A bromelina foi covalentemente imobilizada sobre o polímero. A fixação da enzima foi efetuada diretamente sobre o polímero (ML - bromelain) e também de forma indireta, empregando uma oligoglicina entre o polímero e a enzima (ML - G bromelain). Apesar dos efeitos de difusão devido ao sistema heterogêneo, os autores analisaram os resultados da hidrólise conforme o modelo de Michaelis - Menten. A Figura 2.3 mostra o gráfico de Lineweaver - Burk para os resultados obtidos empregando como substrato o N - benzil - L - arginina etil ester, bromelina livre, bromelina ligada diretamente (ML) e ligada indiretamente (ML-G). Os ensaios

foram efetuados em pH 8,0 a 37 °C.



▲ bromelina livre; □ ML - G bromelina; ● ML bromelina

Fonte: YODOYA et al (2003).

Figura 2.3 – Gráfico de Lineweaver-Burk para bromelina livre e ligada.

Observando a Figura 2.3 pode-se dizer que, apesar do sistema ser heterogêneo, o modelo de Michaelis-Menten representa o fenômeno de maneira satisfatória, indicando que os efeitos de difusão podem ser desprezados.

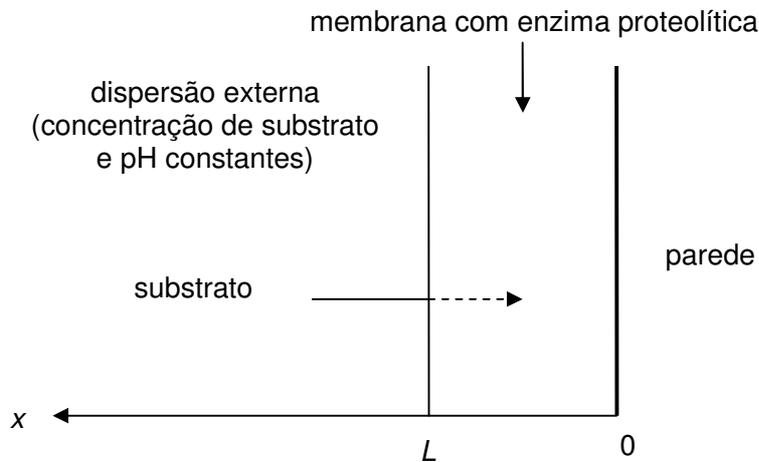
Tabela 2.7 – Parâmetros cinéticos da ação da bromelina livre e ligada.

Enzima	K_m (mol / L)	V_{max} (mol / L.minuto)
Bromelina livre	$(2,6 \text{ a } 3,0) \times 10^{-3}$	$(6,7 \text{ a } 7,3) \times 10^{-5}$
ML bromelina	$(3,0 \text{ a } 3,4) \times 10^{-3}$	$(5,5 \text{ a } 6,1) \times 10^{-5}$
ML-G bromelina	$(2,9 \text{ a } 3,3) \times 10^{-3}$	$(5,0 \text{ a } 5,6) \times 10^{-5}$

Fonte: adaptado de YODOYA et al (2003)

A Tabela 2.7 mostra os resultados para K_m e V_{max} . Nota-se que os valores de K_m são semelhantes. Valores da velocidade máxima das bromelinas imobilizadas são menores que a velocidade máxima para a bromelina livre, sugerindo que a atividade da enzima ligada pode diminuir devido à ligação covalente. Para este trabalho, a enzima foi fornecida pela Sigma Chem. Co. Não

há informação sobre a origem do fruto do qual foi obtida a bromelina.



Fonte: adaptado de OHMORI & YANG (1996).

Figura 2.4 – Sistema membrana – enzima imobilizada.

Foi desenvolvido um modelo para verificação experimental da ação de enzimas imobilizadas em membranas (OHMORI & YANG, 1996), cuja importância está na contribuição para o entendimento de sistemas envolvendo as etapas de reação e difusão. A Figura 2.4 mostra, de forma simplificada, o sistema membrana (gel) – enzima imobilizada utilizado. Neste trabalho os autores adotam, para a velocidade R de reação, a seguinte expressão:

$$R = \frac{k_{cat} C_E C_S}{K_m C_1 + C_S C_2} \text{ com } C_1 = 1 + 10^a C_{H^+} + \frac{10^{-b}}{C_{H^+}} \text{ e } C_2 = 1 + 10^c C_{H^+} + \frac{10^{-d}}{C_{H^+}}$$

onde C_E é a concentração de enzima, C_S a concentração de substrato, K_m a constante de Michaelis, e C_{H^+} a concentração de íons H^+ , todas expressas em mol / m^3 .

A Tabela 2.8 apresenta, com o pH, os sistemas enzima - substrato nos quais o estudo foi baseado. Os valores para os sistemas estudados (Tabela 2.8) encontram-se na Tabela 2.9. As constantes a , b , c , d , K_m e k_{cat} foram determinadas tratando estatisticamente dados experimentais obtidos na literatura. Neste trabalho, os autores admitem mecanismo de reação envolvendo duas etapas, com formação de um intermediário. Citam haver sido sugerido mecanismo com três etapas envolvendo dois intermediários, ou até mesmo mecanismos mais

complexos.

Tabela 2.8 – Sistema de enzimas imobilizadas em membranas

Número	Enzima	Substrato	pH ótimo
2	Tripsina	β - alanilglicina etil ester	8,2
3	Tripsina	N - benzoil - L - alanina metil ester	8,7
4	Bromelina	N - alfa - benzoil - L - arginina etil ester	6,4
5	Fictina	N - alfa - benzoil - L - arginina etil ester	6,5

Fonte: adaptado de OHMORI & YANG (1996).

Tabela 2.9 – Constantes cinéticas para os sistemas enzimáticos imobilizados

Sistema	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mol / m^3)	a	b	c	d
2	2,64	34,2	3,97	6,37	4,11	5,74
3	0,265	106	4,13	7,59	3,65	6,50
4	0,517	189	0,70	6,00	0,90	5,50
5	11,5	47,8	1,60	5,43	2,00	5,27

Fonte: adaptado de OHMORI & YANG (1996).

A espessura L da membrana (Figura 2.4) é pequena quando comparada com as outras dimensões. Apenas um lado é exposto à dispersão de substrato. Conforme o substrato se difunde através da membrana, é hidrolisado cataliticamente pela enzima e o íon H^+ é liberado na membrana. As equações parciais que simulam a variação das concentrações de substrato e o íon H^+ são:

$$\frac{\partial C_S}{\partial t} = -R + D_S \frac{\partial^2 C_S}{\partial x^2} \qquad \frac{\partial A}{\partial t} = R + D_H \frac{\partial^2 A}{\partial x^2}$$

onde t é o tempo, D_S e D_H representam os coeficientes de difusão efetiva (m^2 / s) do substrato e do íon H^+ , respectivamente, e $A = C_{H^+} - C_{OH^-}$ (mol / m^3).

Introduzindo variáveis adimensionais:

$$U = \frac{C_S}{C_{S0}} \qquad V = \frac{A}{C_{S0}} \qquad \theta = \frac{D_H t}{L^2} \qquad \eta = \frac{x}{L} \qquad \phi = \frac{k_{cat} L^2}{D_H}$$

Considerando as condições de contorno:

$$C_S = 0 \quad \text{e} \quad C_{H^+} = C_{H^+}^0 \quad \text{para} \quad t = 0 \quad \text{e} \quad 0 \leq x \leq L$$

$$\frac{\partial C_S}{\partial x} = 0 \quad \text{e} \quad \frac{\partial A}{\partial x} = 0 \quad \text{para} \quad x = 0 \quad \text{e} \quad t > 0$$

$$C_S = C_{S0} \quad \text{e} \quad C_{H^+} = C_{H^+}^0 \quad \text{para} \quad x = L \quad \text{e} \quad t > 0$$

Chega-se a três equações adimensionais, que descrevem o fenômeno:

$$\frac{\partial U}{\partial \theta} = -R' + \frac{D_S}{D_H} \frac{\partial^2 U}{\partial \eta^2} \quad \frac{\partial V}{\partial \theta} = R' + \frac{\partial^2 V}{\partial \eta^2} \quad R' = \frac{\phi C_E U}{K_m C_1 + U C_{S0} C_2}$$

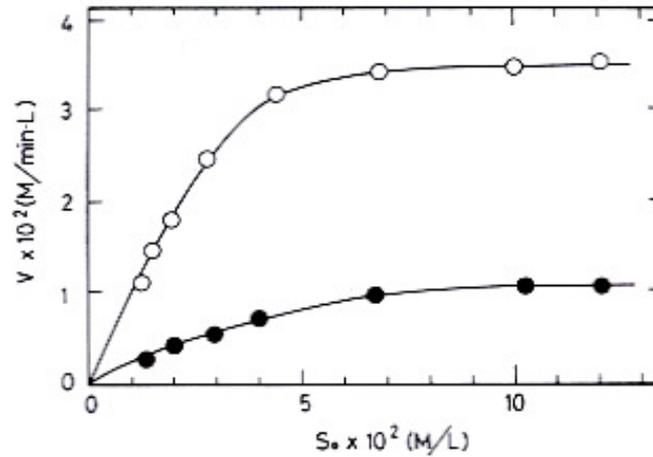
As equações permitem prever o comportamento da ação enzimática quando variamos a concentração de íons H^+ pela variação do pH. A velocidade R da reação é apresentada de forma dependente com a concentração de íons H^+ permitindo estimar a velocidade, para dada concentração de enzima e substrato, quando variamos o pH.

2.5 A ação da bromelina na decomposição de polímeros

Polímeros e copolímeros de aminoácidos tem sido estudados com objetivo de construir peles (tecidos) artificiais biodegradáveis a serem empregados no tratamento de queimaduras e na prevenção contra a aderência de tecidos no pós-operatório ou conseqüências de traumas acidentais. A degradação destes polímeros é atribuída à quebra das cadeias poliméricas pela ação de enzimas proteolíticas.

Foram preparados copolipeptídeos consistindo de N - hidroxietil - L - glutamina e um aminoácido como alanina, leucina, fenilalanina ou valina, para estudar os efeitos da composição molar na velocidade de degradação pela bromelina em um fluido pseudo-extracelular em pH 7,4 e 37 °C, de modo a simular a degradação do polímero *in vivo* (HAYASHI et al, 1991). Foi empregada bromelina adquirida da Nakarai Chem. Co. (os autores não identificam a origem do

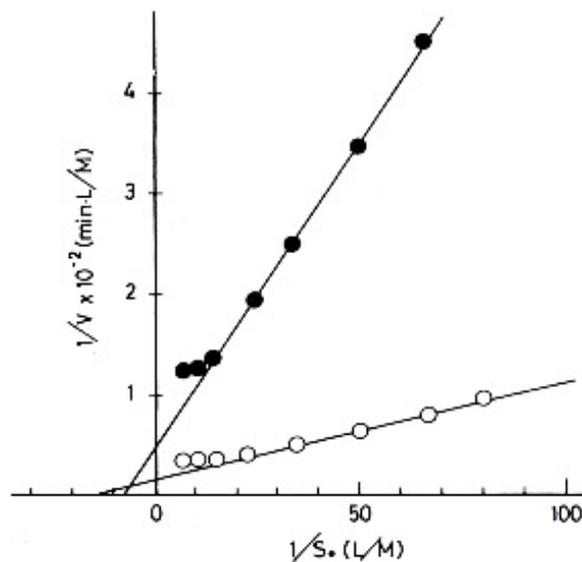
fruto). As medidas foram efetuadas empregando viscosímetro: uma alíquota do polímero foi colocada no viscosímetro, em seguida uma alíquota de enzima, e o valor de viscosidade lido periodicamente, sob rotação constante.



- - polipeptídeo de massa molecular 69400 g / mol.
- - polipeptídeo de massa molecular 50300 g / mol.

Fonte: adaptado de HAYASHI et al. (1991).

Figura 2.5 – Velocidade da reação em função da concentração de substrato.



- - polipeptídeo de massa molecular 69400 g / mol.
- - polipeptídeo de massa molecular 50300 g / mol.

Fonte: adaptado de HAYASHI et al. (1991).

Figura 2.6 – Gráfico de Lineweaver-Burk para os dados da Figura 2.5.

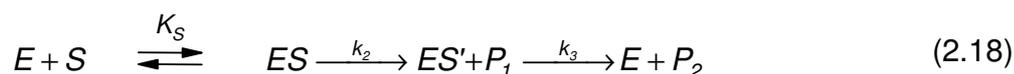
O valor de viscosidade foi adequadamente transformado em concentração. Observou-se que a degradação da cadeia do polipeptídeo pela bromelina ocorre de maneira aleatória. A lei de velocidade foi estudada para os polímeros obtidos. A Figura 2.5 mostra como a velocidade da reação varia com a concentração do substrato S_0 (polímero), para dois polipeptídeos obtidos. Os dados foram colocados de acordo com o gráfico de Lineweaver - Burk, e estão apresentados na Figura 2.6. Deste trabalho verifica-se que a aplicação do modelo de Michaelis - Menten é adequada, uma vez que os dados experimentais se ajustam bem à equação (2.15). Da Figura 2.6 obtém-se valores 0,125 e 0,067 (mol / L) para K_m ; 0,021 e 0,072 (mol / L.minuto) para V_{max} .

HAYASHI et al. (2001) estudaram a hidrólise enzimática de copolipeptídeos consistindo de N - hidroxipropil L - glutamina e leucina, obtidos por reações de aminólise a partir de 3 amino 1 propanol, γ - metil - L - glutamato e leucina. Investigou-se a ação da bromelina sobre este polímero em fluido pseudo-extracelular em pH 7,4 e 37 °C, de modo a simular uma situação *in vivo*. Observou-se que a decomposição do polímero polipeptídeo pela bromelina ocorre de maneira aleatória sobre a cadeia, e que a lei de velocidade também segue o modelo de Michaelis - Menten. Neste trabalho, não há citação com respeito à origem da bromelina.

MIYACHI et al. (1999) estudaram a biodegradação do copoli (N - hidroxietil - D - glutamina) e o copoli (N - hidroxietil - L - glutamina), cobrindo toda a variação de composição de copolímero D e L. Eles foram preparados por reação de aminólise com 2 - amino - 1 - etanol, γ - metil - D - glutamato e γ - metil - L - glutamato. A ação da bromelina na decomposição destes polímeros foi verificada empregando fluido pseudo-extracelular em pH 7,4 e 37 °C, simulando uma situação *in vivo*. A exemplo dos dois trabalhos anteriormente comentados, os dados de degradação das amostras mostraram que a ação enzimática da bromelina sobre o polipeptídeo acontece de forma aleatória e a lei de velocidade também segue o modelo de Michaelis - Menten. Não há informação sobre a origem do fruto de onde se obteve a bromelina.

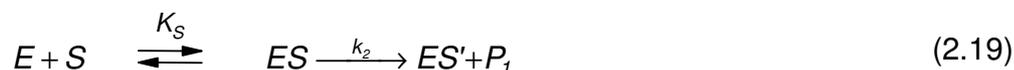
2.6 A ação da bromelina: um mecanismo de três etapas

Um mecanismo de três etapas envolvendo dois intermediários pode estar associado às enzimas alfa - quimotripsina, tripsina, bromelina, fictina e papaína (OHMORI & YANG, 1996). O mecanismo das reações da alfa - quimotripsina é proposto da seguinte forma (BENDER et al., 1964):



onde E é a enzima, S o substrato, ES e ES' são complexos intermediários enzima-substrato, P_1 e P_2 os produtos formados, K_S a constante de equilíbrio, k_2 e k_3 constantes de velocidade.

Neste trabalho, foram estudados a acilação (introdução do grupo C=O na molécula) da alfa - quimotripsina pelo p - nitrofenil acetato, e a hidrólise catalítica, pela alfa - quimotripsina, de duas amidas (substratos): N - acetil - L - triptofano etil ester e N - acetil - L - fenilalanina amida. Em trabalho prévio, os autores estudaram k_3 , que é consequência de reações de de-acilação da alfa - quimotripsina; ES' é, portanto, um complexo acil - alfa - quimotripsina.



A determinação de k_2 e K_S foi feita empregando como substrato o p - nitrofenil acetato com concentração muito maior que a concentração da enzima, levando em consideração a reação (2.19).

Tabela 2.10 – Cinética da acilação da alfa- quimotripsina pelo p - nitrofenil acetato (25 °C).

pH	Tampão	k_2 (s ⁻¹)	$K_S \times 10^3$ (M)
6,58	Fosfato	2,00 a 2,62	1,39 a 2,03
7,09	Fosfato	3,45 a 3,87	1,39 a 1,55
9,21	Carbonato	0,955 a 1,135	0,47 a 0,69

Fonte: adaptado de: BENDER et al. (1964).

Com esta abordagem, o primeiro passo da reação (2.19) pode ser considerada de ordem um com relação à enzima. Alguns valores encontrados

para k_2 e K_S estão apresentados na Tabela 2.10.

Uma segunda abordagem envolve cinética de ordem dois com concentração de enzima igual à de substrato, ambas bem menores que K_S . Para o estudo da hidrólise das amidas N - acetil - L - triptofano etil ester e N - acetil - L - fenilalanina amida pela alfa - quimotripsina, os autores desenvolveram o modelo da reação (2.18) e chegaram a:

$$k_{cat} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} \quad K_{m\ ap} = \frac{k_3 K_S}{k_2 + k_3}$$

onde $K_{m\ ap}$ é a constante de equilíbrio aparente.

As Tabelas 2.11 e 2.12 mostram alguns valores encontrados para a hidrólise dos dois substratos citados. A razoável concordância dos valores experimentais encontrados com o modelo leva à conclusão de que a equação (2.18) é aplicável. Os valores de k_2 , K_S , k_{cat} e $K_{m\ ap}$ são fortemente dependentes do pH.

Tabela 2.11 – Hidrólise do N- acetil- L- triptofano etil ester pela alfa- quimotripsina (25 °C)

pH	Tampão	k_{cat} (s ⁻¹)	$K_{m\ ap} \times 10^5$ (M)
6,40	Fosfato	10,35 a 11,05	5,1 a 8,3
7,09	Fosfato	26,4 a 29,2	4,8 a 9,8
9,49	Carbonato	41,6 a 49,6	30,8 a 48,0
10,40	Carbonato	28,6 a 31,0	93,1 a 107,5

Fonte: adaptado de: BENDER et al. (1964).

Tabela 2.12 – Hidrólise do N- acetil- L - fenilalanina amida pela alfa - quimotripsina (25 °C)

pH	Tampão	$k_{cat} \times 10^2$ (s ⁻¹)	$K_{m\ ap} \times 10^2$ (M)
5,71	Fosfato	0,61	2,0
7,62	Fosfato	4,3	1,6
9,05	Carbonato	2,8	3,0
9,95	Carbonato	1,2	5,4

Fonte: adaptado de: BENDER et al. (1964).

2.7 Desativação da bromelina

Bromelina isolada do fruto cultivado na ilha de Cheju (Coréia do Sul), perde atividade rapidamente acima de 40 °C. A presença do substrato caseína aumenta a estabilidade térmica da bromelina, tornando-a estável até 45 °C (KO & KANG, 1990).

Estudos sobre a inativação e desnaturação da bromelina foram efetuados em solventes orgânicos (álcool etílico, álcool metílico e etileno glicol). Os resultados indicaram que o centro ativo da bromelina é sensível a solventes orgânicos, observando-se que a inativação e a desnaturação compõe-se de dois estágios (um rápido e um lento) sugerindo a presença de um intermediário de transição (CHEN et al., 1993).

GODOI (2007) estudou as condições de pH e temperatura, concluindo que soluções de bromelina pura em pH próximo de 4 é mais estável tanto com relação ao tempo quanto com relação à temperatura.

Com relação à desativação térmica da bromelina, as publicações consultadas (HAYASHI & IKADA, 1991; ARROYO-REYNA & HERNANDEZ – ARANA, 1995; SRIWATANAPONGSE, BALABAN & TEIXEIRA, 2000; LI & LIN, 2001; YODOYA et al., 2003), referem-se a ela como sendo uma cinética de ordem um na forma:

$$\ln A = \ln A_0 - k_i \theta \quad (2.20)$$

onde θ é o tempo, A a atividade após um tempo θ , A_0 a atividade inicial e k_i a constante de velocidade de inativação.

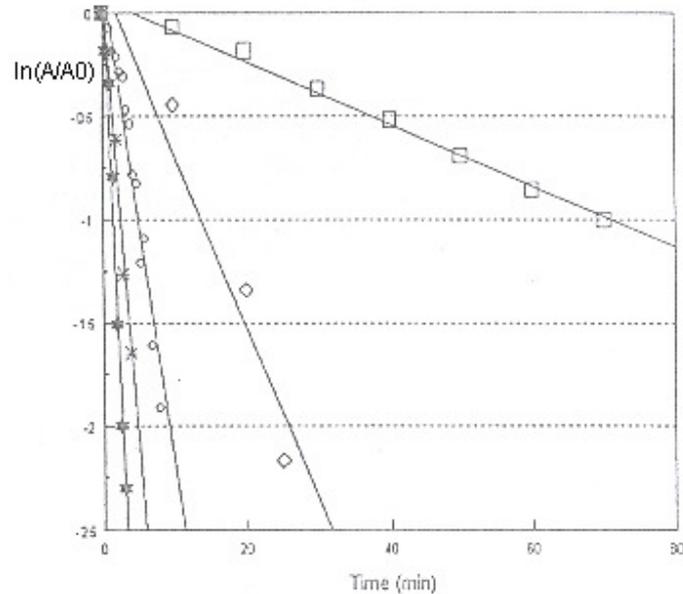
A constante de velocidade de inativação segue a lei de Arrhenius:

$$k_i = k_0 e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (2.21)$$

onde k_0 é o fator de frequência, E_a é a energia de ativação, R é uma constante ($R = 8,3144 \text{ J / mol.K}$), e T é a temperatura em graus Kelvin.

SRIWATANAPONGSE, BALABAN & TEIXEIRA (2000) efetuaram experimentos para verificar a inativação térmica da bromelina a 55 °C, 60 °C,

63 °C, 65 °C e 67 °C. Para tanto, empregaram o fruto *smooth Cayenne pineapple*. O gráfico obtido da atividade enzimática em função do tempo encontra-se na Figura 2.7.



□: 55 °C; ◇: 60 °C; ○: 63 °C; *: 65 °C; ★: 67 °C

Fonte: adaptado de SRIWATANAPONGSE, BALABAN & TEIXEIRA (2000).

Figura 2.7 – Gráfico da atividade em função do tempo.

A dependência entre k_i e a temperatura foi analisada com base na equação (2.22), que é a equação (2.21) modificada.

$$\ln k_i = \ln k_0 - \frac{E_a}{RT} \quad (2.22)$$

A correlação linear entre $\ln k_i$ e $\frac{1}{T}$ apresentou valor confiável, obtendo-se $E_a = 3,26 \times 10^5$ J / mol para a energia de ativação e $k_0 = 1,37 \times 10^{50}$ minuto⁻¹ para o fator de freqüência.

Um mecanismo alternativo para o processo de desativação térmica é (ARROYO-REYNA & HERNANDEZ –ARANA, 1995):



onde U é o desmembramento da espécie original N , k_1 a constante de velocidade no sentido da formação de U , k_{-1} a constante de velocidade no sentido da formação de N , e k_D a constante de velocidade no sentido da formação de D . Admitindo-se que o equilíbrio é sempre atingido, a formação de D obedece a uma cinética de ordem um com constante de velocidade aparente dada por:

$$k_{ap} = \frac{k_D K}{K + 1} \quad (2.24)$$

onde: $K = \frac{k_1}{k_{-1}}$

Em baixas temperaturas, $k_1 \ll k_{-1} \gg k_D$, então U estará presente em pequenas quantidades. Também, K terá valor bem menor que 1, assim $k_{ap} \cong k_D K$. Em temperaturas elevadas $k_1 \gg k_{-1}$; a concentração de U se eleva, e $K \gg 1$. Segue-se então que $k_{ap} \cong k_D$. Portanto, é esperado que, em uma faixa relativamente ampla de variação de temperatura, a energia de ativação deve variar, uma vez que estarão acontecendo processos diferentes de decomposição. Entretanto, as observações experimentais em diferentes temperaturas mostraram valores razoavelmente constantes para a energia de ativação. Reavaliando o modelo, considerando agora $k_{-1} \ll k_D \gg k_1$ para toda a faixa de temperatura estudada, resulta que o equilíbrio nunca é alcançado, e a concentração de U é sempre muito baixa. Neste caso, $k_{ap} \cong k_1$, e a energia de ativação representa a barreira de energia para a reação $N \rightarrow U$. Esta consideração é compatível com a observação experimental de valores constantes para a energia de ativação. Pode-se chegar à mesma conclusão, se considerarmos que a bromelina nativa está em equilíbrio metaestável, quer dizer, a irreversibilidade é devido à incapacidade das moléculas formadas na decomposição reagruparem-se na forma original.

3 Materiais e métodos

Os ensaios de hidrólise da caseína pela bromelina foram efetuados nos Laboratórios de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Escola de Engenharia Mauá do Instituto Mauá de Tecnologia. A bromelina pura, tomada como referência, foi fornecida pela Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP. O abacaxi variedade pérola, do qual aproveitou-se a casca e o talo do fruto, foi adquirido diretamente do mercado. Como substrato, foi utilizada a caseína. Os reagentes utilizados nos ensaios estão apresentados no Apêndice I. Todos os reagentes empregados foram de grau analítico.

Para a execução dos ensaios o meio reacional foi tamponado, garantindo a reação com pH constante. A reação foi interrompida adicionando-se uma alíquota do meio reacional a uma solução de ácido tricloroacético (TCA), momento em que toda a proteína não reagida foi precipitada. A calibração do aparelho para determinação da absorbância foi efetuada com tirosina. Os reagentes empregados nestes casos foram denominados reagentes auxiliares. Os preparos referentes a este item encontram-se no Apêndice II.

As dosagens foram efetuadas empregando:

- Para massa: balança analítica Shimadzu AY220, especificada para até 220 gramas com leitura até 10^{-4} gramas.
- Para volume: pipetas e balões volumétricos.

O controle do pH foi efetuado com um pHmetro Micronal B474 equipado com compensador automático de temperatura. O aparelho foi calibrado com soluções padrão em pH 4,0 e 7,0 a cada início dos trabalhos, e também a cada conjunto de 25 a 30 leituras.

3.1 Meio reacional

A hidrólise do substrato foi efetuada em um reator (béquer de 100 mL) com agitador de vidro com rotação variável. A rotação escolhida foi a máxima

possível de modo a não permitir incorporação de ar ao meio reacional, o que causaria erro na quantidade pipetada para análise dos aminoácidos formados. A Figura 3.1 mostra o reator e agitador utilizados.



Figura 3.1 – Fotografia do reator com o agitador.

O volume útil do reator foi imerso em um banho para controle de temperatura. O banho termostático utilizado (QUIMIS) contou com refrigeração e aquecimento, permitindo rigoroso controle de temperatura. A Figura 3.2 mostra o banho termostático empregado.



Figura 3.2 – Fotografia do banho termostático.

3.1.1 Aquecimento do meio reacional

O aquecimento foi uma preocupação na execução dos ensaios. O tempo envolvido para elevação da temperatura ambiente até a temperatura desejada deveria ser o mínimo possível, de modo a evitar a desativação térmica da bromelina durante o aquecimento. Dois procedimentos foram considerados:

Ensaio para a determinação da atividade no planejamento experimental e ensaios para a cinética enzimática:

A dispersão de substrato (caseína) foi aquecida de modo que a mistura final, substrato e dispersão de bromelina, ficasse o mais próximo possível da temperatura desejada. Para tanto, a temperatura da dispersão de substrato foi calculada conforme segue:

$$massa_{\substack{\text{solução} \\ \text{caseína}}} c_{P\text{solução}}_{\substack{\text{solução} \\ \text{caseína}}} (t - t_{\text{ensaio}}) = m_{\substack{\text{solução} \\ \text{bromelina}}} c_{P\text{solução}}_{\substack{\text{solução} \\ \text{bromelina}}} (t_{\text{ensaio}} - t_{\text{ambiente}}) \quad (3.1)$$

onde t é a temperatura em que devemos aquecer a dispersão de substrato, c_p é o calor específico e m a massa.

As concentrações empregadas foram tais que, para o cálculo, a densidade pôde ser considerada igual a 1 g / cm^3 e o calor específico igual ao da água ($1 \text{ cal / g } ^\circ\text{C}$). Estas considerações mostraram-se satisfatórias uma vez que a temperatura do meio reacional atingiu valores bem próximos ao desejado. Logo após a mistura o meio reagente foi colocado no banho termostático. O tempo decorrido para atingir a homeotermia foi menor do que 1 minuto. Neste caso a desativação térmica foi considerada desprezível.

Ensaio para determinação da atividade nos testes de estabilidade térmica:

Neste caso, tanto a dispersão de substrato como da enzima tiveram que ser aquecidas até a temperatura do ensaio e nela mantidas, em separado, ao longo do tempo. Para permitir a determinação da atividade no tempo zero, com mínimo de tempo envolvido para o aquecimento desde a temperatura ambiente, foi empregado um forno de micro-ondas. A temperatura almejada foi atingida em aproximadamente 40 a 50 segundos. Ao atingir a temperatura, as dispersões

foram colocadas no banho termostático. Descartou-se qualquer efeito das micro-ondas nas dispersões, uma vez que elas não são ionizantes.

3.2 Rotina dos ensaios

A rotina dos ensaios foi:

- Pipetar 50 mL da dispersão de caseína e adicionar ao reator.
- Instalar o reator no banho termostático, iniciar a agitação.
- Pipetar 25 mL da dispersão de bromelina, ou do extrato, e adicionar no reator.
- O tempo zero foi considerado após a adição de toda a enzima.

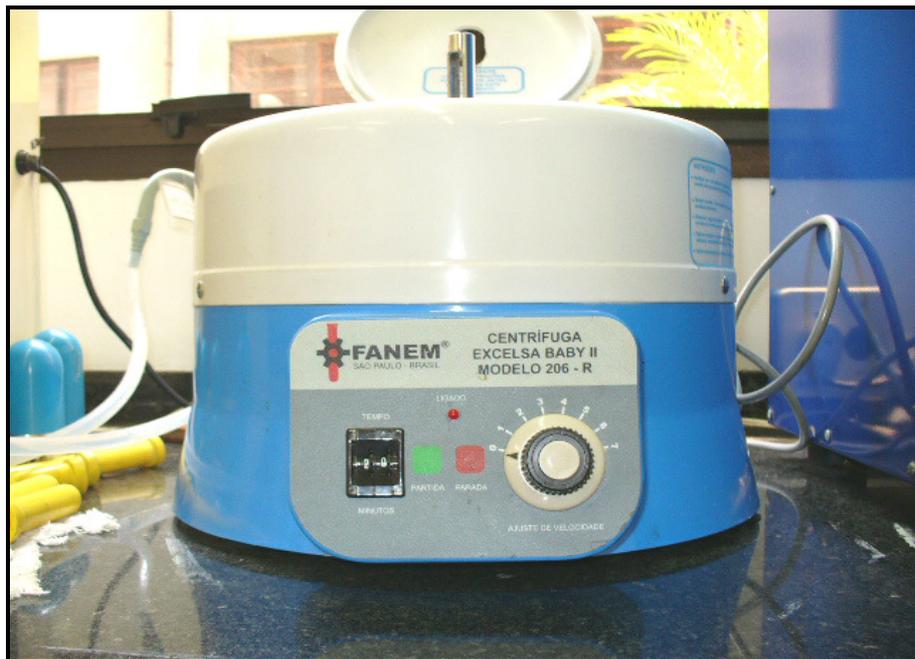


Figura 3.3 – Fotografia da centrífuga.

- Após o tempo de reação pré-determinado, foi pipetada uma amostra do meio reacional e adicionada a um tubo de centrífuga, já com uma solução de TCA 0,3 M. O TCA precipita a enzima e a proteína não reagida, extinguindo a reação de hidrólise. O tempo de reação considerado foi desde o zero até total adição da amostra na solução de TCA.

- Os tubos com as amostras foram centrifugados a 5000 rpm, empregando centrífuga marca FANEM, cuja fotografia encontra-se na Figura 3.3.
- O sobrenadante foi passado para uma cubeta de quartzo e lida a absorbância.

Em alguns ensaios esta rotina foi alterada de modo a adaptá-la para determinadas situações. Estas adaptações serão comentadas oportunamente.

3.3 Preparo da dispersão de caseína

A dispersão de caseína foi preparada conforme a necessidade, no máximo na véspera do ensaio e mantida sob refrigeração (0 °C). A quantidade foi definida em função dos ensaios previstos. A rotina do preparo foi:

- Pesar a caseína em um béquer.
- Adicionar, a temperatura ambiente, aproximadamente 80 % da água total.
- Iniciar, com aquecimento, agitação empregando agitador magnético.
- Durante a dispersão, adicionar NaOH 1 M de modo a manter o pH entre 6,5 e 7,0.
- Agitar até completa dispersão, com aquecimento podendo atingir de 80 a 85 °C.
- Resfriar até temperatura ambiente.
- Adicionar tampão tomando como base a proporção 1 mL de solução tampão para cada 20 mL de dispersão de caseína na concentração de 20 g / L. Para valores fracionados arredondou-se o volume da solução tampão para o valor imediatamente acima, de modo a permitir a sua dosagem com pipeta.
- Ajustar o pH para o valor desejado empregando NaOH 1 M ou HCl 1 M.
- Passar para um balão volumétrico e avolumar até a marca de aferição.

A Figura 3.4 mostra a fotografia do agitador magnético com aquecimento, e sobre ele um balão com dispersão de caseína.

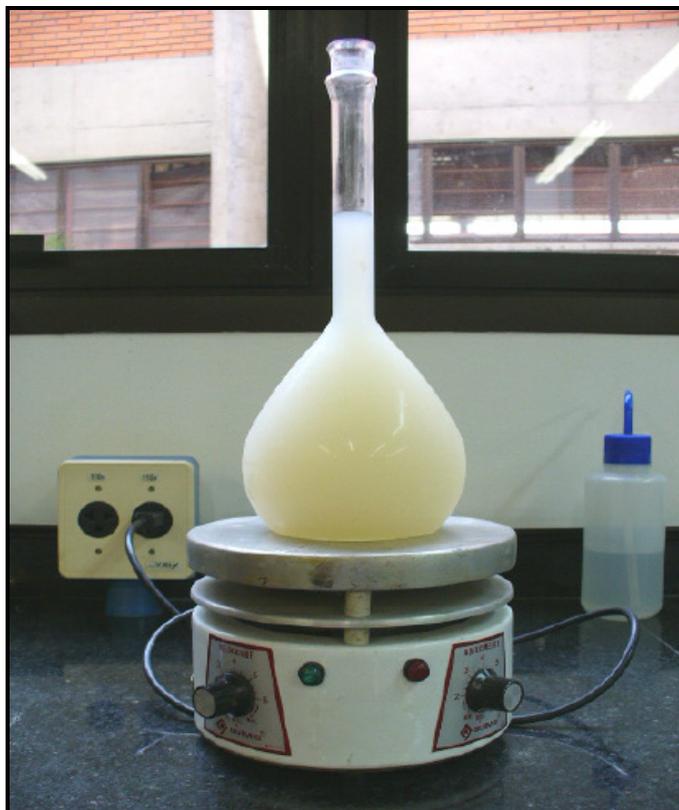


Figura 3.4 – Fotografia do agitador magnético. No balão, dispersão de caseína.

3.4 Preparo da dispersão de bromelina pura

Para o preparo da dispersão de bromelina pura seguiu-se rotina semelhante àquela empregada para a caseína. Foi efetuada conforme a necessidade, no máximo na véspera do ensaio, e mantida sob refrigeração (0 °C). A quantidade preparada foi em função dos ensaios previstos:

- Pesar a enzima em um béquer.
- Adicionar água a temperatura ambiente.
- Iniciar agitação empregando agitador magnético (sem aquecimento).
- Adicionar tampão tomando como base a proporção 1 mL de solução tampão para cada 20 mL de dispersão de bromelina na concentração de

2 g / L. Para valores fracionados arredondou-se o volume da solução tampão para o valor imediatamente acima, de modo a permitir a sua dosagem com pipeta.

- Ajustar o pH para o valor desejado empregando NaOH 1 M ou HCl 1 M.
- Passar para um balão volumétrico e avolumar até a marca de aferição.

3.5 Expressão da atividade enzimática e da velocidade inicial da reação de hidrólise

Quando a caseína é submetida à ação da bromelina ela sofre hidrólise liberando aminoácidos, dentre eles os aromáticos (tirosina, triptofano e fenilalanina) que são detectáveis por absorbância a 280 nm de comprimento de onda. A correlação entre absorbância e os aminoácidos aromáticos foi feita empregando tirosina em diversas concentrações. Assim, leu-se a absorbância e expressou-se a leitura em milimol de tirosina por litro, que corresponde aos produtos formados pela hidrólise.

Atividade:

A atividade A foi expressa em milimol de tirosina por litro após 10 minutos de reação, conforme a equação (3.2).

$$A = \frac{\text{milimol de tirosina}}{\text{litro} \times 10 \text{ minutos}} \left(\frac{\text{mmol}}{\text{L minuto}} \right) \quad (3.2)$$

Velocidade inicial:

Para a velocidade foram feitas leituras de absorbância ao longo do tempo. A velocidade inicial v foi calculada para o tempo zero, conforme será comentado no item 3.15. A equação (3.3) mostra sua expressão.

$$v = \frac{\text{milimol de tirosina}}{\text{litro} \times \text{minuto}} \left(\frac{\text{mmol}}{\text{L minuto}} \right) \quad (3.3)$$

Observa-se que a atividade e a velocidade inicial tem a mesma dimensão.

3.6 Ensaio com a bromelina pura

Empregou-se bromelina pura e caseína. As relações enzima / substrato foram 1 / 25, 1 / 50 e 1 / 125, em massa, escolhidas em função do que se encontra nas publicações citadas no Capítulo 2 (Revisão bibliográfica) e também considerando que quantidades menores de enzima poderiam gerar pouca quantidade de aminoácidos aromáticos, comprometendo a leitura de absorbância.

Para determinação da atividade foi fixado, como padrão de ensaio, 50 mL da dispersão de caseína na concentração de 20 g / L, sobre a qual adicionou-se 25 mL da dispersão de enzima nas concentrações 1,6 g / L, 0,8 g / L e 0,32 g / L, totalizando, portanto, 75 mL de meio reacional.

Para determinação da velocidade inicial mantiveram-se os 25 mL da dispersão de enzima na concentração correspondente à relação enzima / substrato em estudo, e o mesmo volume da dispersão de caseína (50 mL), porém variando sua concentração de 20 até 2 g / L.

3.7 Obtenção do extrato da casca e do talo do abacaxi

Os frutos foram adquiridos diretamente do mercado local (São Caetano do Sul - SP). O procedimento para obter o extrato da casca e do talo obedeceu a seguinte seqüência:

- Retirada da coroa.
- Lavagem dos frutos com água corrente.
- Separação da casca e do talo.
- Corte em pedaços pequenos, conforme ilustrado na Figura 3.5, de modo a facilitar a próxima etapa.
- Triturar no JUICER MULTIUSO PJE-800S (fabricante PREMIUM) mostrado na Figura 3.6 (vista de topo) e na Figura 3.7 (vista lateral). Este equipamento tritura e separa o bagaço por centrifugação. O extrato é recolhido na jarra

junto ao equipamento, à direita.

- Acondicionar o extrato em garrafas e estocar no *freezer* em temperatura abaixo de 20 °C negativos.
- Imediatamente antes dos ensaios, descongelar e centrifugar (5000 rpm) por três minutos para separar sólidos em suspensão.



Figura 3.5 – Fotografia da casca (à esquerda) e do talo (à direita) cortados.



Figura 3.6 – Fotografia do JUICER MULTIUSO PJE-800S (fabricante PREMIUM) – vista de topo.



Figura 3.7 – Fotografia do JUCER MULTIUSO PJE-800S (fabricante PREMIUM) – vista lateral.

3.7.1 Determinação da quantidade de extrato a ser empregada

Para determinar a quantidade de extrato tomou-se como orientação o trabalho de TISSEAU (1986), que registrou a presença de 1 a 2 gramas de bromelina por quilograma de fruto. Variou-se a quantidade (massa) de extrato, medindo a atividade enzimática correspondente. Com a correlação entre a atividade e a quantidade de extrato determinou-se a quantidade correspondente à atividade obtida para a bromelina pura nas relações enzima / substrato de 1 / 25, 1 / 50 e 1 / 125 (ver item 3.6). Com este procedimento procurou-se trabalhar o mais próximo possível da quantidade empregada nos testes com a bromelina pura.

3.7.2 Preparo e ensaios com o extrato

A descrição do preparo da dispersão de extrato segue aquela encontrada no item 3.4 para o preparo da dispersão de bromelina pura, ou seja: pesagem do extrato em um béquer, adição de água, agitação, tamponamento, acerto do pH e avolumar com água.

Os ensaios seguiram o que já foi descrito no item 3.6, ou seja, de forma

resumida: adição de 25 mL da dispersão do extrato sobre 50 mL da dispersão de caseína, para determinação da atividade e da cinética, mantendo-se como padrão o total de 75 mL. Em alguns casos, onde a quantidade de extrato ultrapassou 25 mL, houve necessidade de trabalhar com 50mL do extrato e 25 mL de caseína com o dobro da concentração; estes casos serão comentados oportunamente.

3.8 Leitura da absorbância

A leitura da absorbância α foi feita no espectrofotômetro VARIAN modelo CARY 1E. Este equipamento está mostrado na Figura 3.8.

As amostras foram colocadas em uma cubeta de quartzo, recomendada para emprego no comprimento de onda utilizado, com espaçamento interno de 10 mm. As cubetas, uma com a amostra e outra com água, foram instaladas nas câmaras apropriadas, que podem ser observadas no detalhe do aparelho mostrado na Figura 3.9.

Os valores de absorbância foram lidos a 280 nm para determinar a quantidade de aminoácidos aromáticos presentes. Com a curva de calibração calculou-se a correspondência em mmol de tirosina por litro.



Figura 3.8 – Fotografia do espectrofotômetro VARIAN modelo CARY 1E.

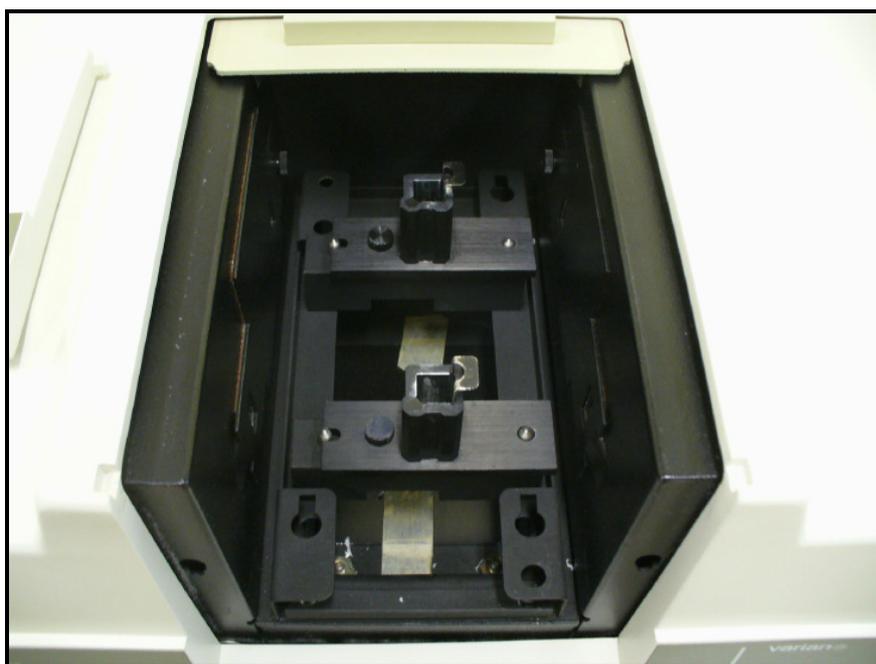


Figura 3.9 – Fotografia da câmara para instalação das cubetas com as amostras.

3.8.1 Determinação da curva de calibração

Foram lidas as absorvâncias correspondentes a várias concentrações de tirosina. As concentrações utilizadas constam no Apêndice II. O espectrofotômetro possui um programa que fornece a curva de calibração com o tratamento estatístico adequado. A resposta é um gráfico da absorvância α em função da concentração (mmol tirosina / L) com a equação:

$$\alpha = B \times \text{concentração} + D \quad (3.4)$$

onde B e D são constantes. Fornece ainda o coeficiente de correlação. Portanto, a concentração de tirosina C_{tir} para os ensaios foi calculada:

$$C_{tir} = \frac{\alpha - D}{B} \left(\frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right) \quad (3.5)$$

3.9 Cálculo da concentração dos aminoácidos aromáticos formados pela hidrólise do substrato

Tanto a atividade enzimática quanto a cinética do processo de hidrólise do substrato foram avaliadas pela quantidade de aminoácidos aromáticos resultantes da decomposição da caseína. Estes aminoácidos foram expressos em tirosina. Para o cálculo considerou-se primeiro a diluição que a amostra do meio reacional sofre quando adicionada ao tubo de centrífuga contendo TCA 0,3 M, e depois a curva de calibração da absorbância em função da tirosina (item 3.8.1) que fornece a equação (3.5).

Como se trabalhou com soluções aquosas bem diluídas, para o cálculo das relações entre concentrações utilizou-se a equação (3.6).

$$V_{\text{meio reacional}} \cdot C_{\text{meio reacional}} = V_{\text{tubo}} \cdot C_{\text{tubo}} \quad (3.6)$$

onde $V_{\text{meio reacional}}$ é o volume da amostra pipetada do reator e V_{tubo} é o volume total (amostra do reator mais TCA 0,3 M) no tubo da centrífuga (ambos em mL); $C_{\text{meio reacional}}$ é a concentração de aminoácidos no meio reacional e C_{tubo} é a concentração de aminoácidos no tubo da centrífuga, ambos expressos em mmol tirosina / L.

Da equação (3.6) vem:

$$C_{\text{meio reacional}} = \frac{V_{\text{tubo}} \cdot C_{\text{tubo}}}{V_{\text{meio reacional}}} \quad (3.7)$$

A partir da equação (3.5) pode-se escrever:

$$C_{\text{tubo}} = \frac{\alpha_{\text{tubo}} - D}{B} \quad (3.8)$$

onde α_{tubo} é a leitura de absorbância obtida da amostra contida no tubo de centrífuga

Substituindo a equação (3.8) na equação (3.7):

$$C_{\text{meio reacional}} = \frac{V_{\text{tubo}} \cdot \left(\frac{\alpha_{\text{tubo}} - D}{B} \right)}{V_{\text{meio reacional}}} \quad \left(\frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right) \quad (3.9)$$

3.10 Determinação da referência analítica (branco) nos ensaios com bromelina pura

Foram feitos espectros da absorvância com amostras das soluções dos diversos reagentes auxiliares, nas concentrações empregadas, variando o comprimento de onda desde 190 nm até 350 nm. Os resultados estão apresentados na Figura 3.10, onde se pode observar que nenhum deles mostrou leitura a 280 nm.

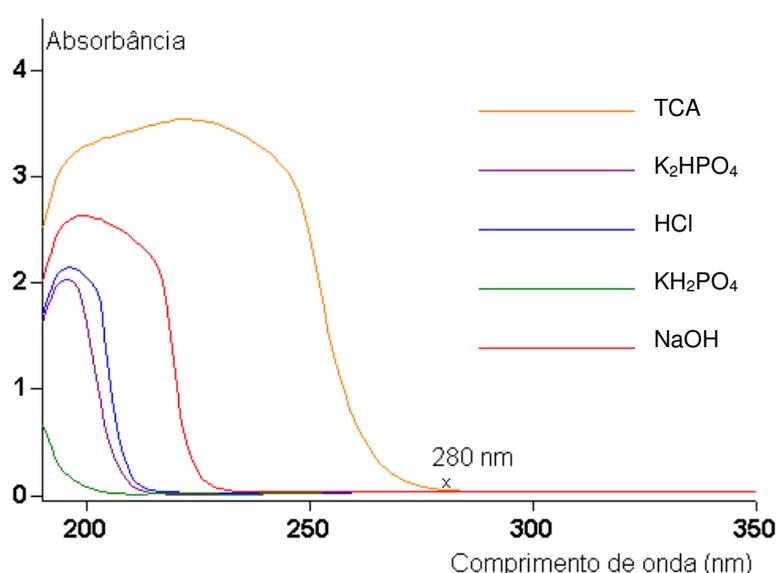


Figura 3.10 – Espectro da absorvância dos diversos reagentes utilizados.

Tanto para a bromelina pura quanto para a caseína decidiu-se não fazer o espectro de absorvância porque é certo que apresentariam leitura no comprimento de onda considerado, uma vez que possuem aminoácidos aromáticos na sua estrutura molecular. Para estes materiais, o que interessou foi saber se eles apresentariam alguma leitura a 280 nm após dispersão e precipitação com TCA, possivelmente decorrente de alguma degradação da proteína com o tempo. Assim, para os ensaios com a bromelina pura a absorvância foi lida em comparação com a água e, no cálculo, descontou-se a concentração correspondente ao resíduo detectável a 280 nm.

Portanto, os seguintes procedimentos foram adotados:

Branco para a bromelina pura:

Com relação à bromelina pura preparou-se uma dispersão 0,5333 g / L com o pH tamponado no valor de 7,0; valor considerado como ponto central no planejamento experimental, que será discutido mais adiante. A concentração considerada corresponde à concentração da enzima no meio reacional com volume total de 75 mL (25 mL bromelina mais 50 mL caseína) para a relação 1 enzima / 25 substrato. Retirou-se 5 mL e adicionou-se no tubo da centrífuga com 5 mL de TCA 0,3 M.

Foram efetuados ensaios e a absorbância a 280 nm lida em duplicata. O valor obtido foi devido a alguma substância presente na amostra de bromelina utilizada, e que é sensível a 280 nm. Com o valor médio foi calculada a correspondente concentração, em mmol tirosina / L, aplicando a equação (3.9). Este valor de concentração deverá ser subtraído daqueles encontrados nos ensaios para determinação da atividade, da estabilidade térmica e da cinética. Para os ensaios empregando relação 1 enzima / 50 substrato e 1 enzima / 125 substrato tomou-se o valor proporcional de concentração a ser subtraído.

Branco para a caseína:

Com relação à caseína, adotou-se procedimento similar ao daquele para a bromelina pura: preparou-se uma dispersão 13,3333 g / L com o pH tamponado no valor 7,0 (ponto central do planejamento experimental). A concentração considerada corresponde à concentração da caseína no meio reacional com volume total de 75 mL (25 mL de bromelina mais 50 mL de caseína).

Neste caso, considerou-se que a proporção entre a amostra do meio reacional e a quantidade de TCA 0,3 M poderia variar em função do valor de absorbância a ser lido. Nos ensaios em que a quantidade de aminoácidos aromáticos liberados seria previsivelmente menor (ensaios com relação enzima / substrato de 1 / 125 e ensaios para determinação da cinética com concentrações menores de caseína) trabalhou-se com proporção amostra / TCA maior. Assim, utilizaram-se 3 proporções diferentes, a saber: 5 mL do meio reacional + 5 mL TCA 0,3 M; 3 mL do meio reacional + 6 mL TCA 0,3 M e 5 mL do

meio reacional + 2 mL TCA 0,3 M. O ensaio em 3 proporções diferentes forneceu a importante informação adicional de saber se a quantidade de TCA foi suficiente para precipitar toda a proteína não hidrolisada nos 3 casos, uma vez que os resultados deveriam apontar para o mesmo valor.

Foram efetuados ensaios para cada caso e a absorbância a 280 nm lida em duplicata. Os valores obtidos foram devido a alguma substância presente na amostra de caseína utilizada, e que é sensível a 280 nm. Com os valores foram calculadas as correspondentes concentrações, em mmol tirosina / L, aplicando a equação (3.9). Este valor de concentração deverá ser subtraído daqueles encontrados nos ensaios para determinação da atividade, da estabilidade térmica e da cinética.

3.11 Determinação da referência analítica (branco) nos ensaios com extrato

Durante o preparo do extrato observou-se uma natural coloração amarronzada. Diferente da bromelina pura, o extrato do fruto apresenta, além da enzima, várias outras substâncias em concentrações bem maiores do que a própria enzima (CESAR, 2005). Não se trata, portanto, de abordar a determinação do branco da mesma forma como no caso da bromelina pura, onde se considerou que a interferência seria devida à pequena quantidade de aminoácidos aromáticos, liberados pela decomposição da própria bromelina.

3.11.1 Avaliação qualitativa

Para observar qualitativamente a absorbância correspondente às substâncias presentes no extrato que poderiam apresentar leitura a 280 nm e, portanto, confundir-se com a leitura de absorbância dos aminoácidos aromáticos formados na hidrólise, procedeu-se conforme segue (como foi uma análise qualitativa, as quantidades manipuladas foram aproximadas):

- Pesar 4 gramas de extrato.
- Adicionar 50 mL de água e 5 mL de solução tampão.

- Acertar o pH em 5,5.
- Completar o volume para 75 mL.
- Retirar 3 mL e adicionar em 3mL de TCA 0,3 M em um tubo de centrífuga.
- Centrifugar a 5000 rpm durante 20 minutos e ler a absorbância.

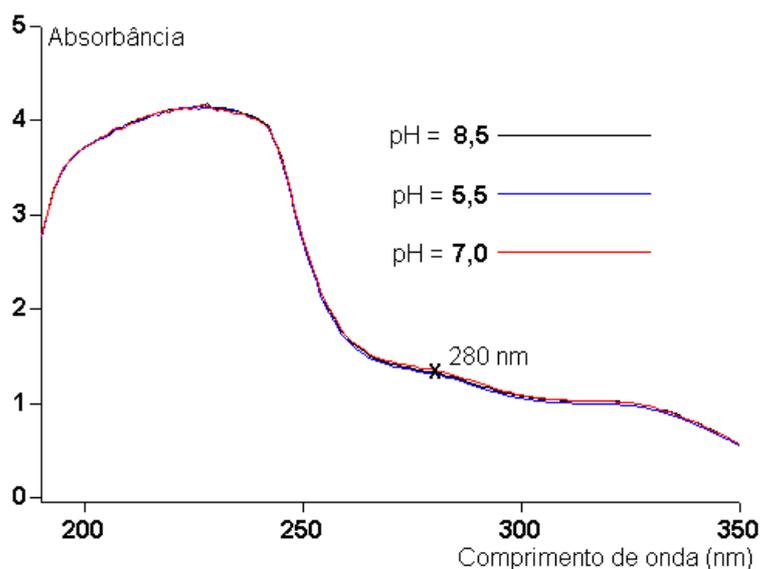


Figura 3.11 – Espectro da absorvância α do extrato em diversos valores de pH.

Para verificar se a variação da concentração hidrogeniônica poderia alterar alguma substância de modo que ela viesse a apresentar mudança na absorvância, o ensaio foi repetido para pH em 7 e pH em 8,5 (valores escolhidos em função do planejamento experimental, que será discutido mais adiante).

Os resultados obtidos encontram-se na Figura 3.11. Observa-se que, na variação de pH ensaiada, não há interferência da concentração de íons H^+ na absorvância. Observa-se também que há considerável presença de substâncias que apresentam leitura no comprimento de onda de 280 nm.

3.11.2 Procedimento para determinação do branco

As leituras de absorvância para os ensaios com extrato foram feitas empregando o branco obtido conforme o seguinte procedimento:

- Pesar, em um béquer, a quantidade de extrato necessária para o número de ensaios previsto, acrescido de mais um ensaio.
- Adicionar em torno de 60 % da água necessária.
- Adicionar solução tampão na proporção de 1 mL para cada 15 mL da dispersão do extrato. Aumentou-se a quantidade, com relação à bromelina pura, devido ao extrato conter outras substâncias, além da enzima. Esta proporção mostrou-se adequada para o controle do pH, conforme observado experimentalmente.
- Acertar o pH para o valor desejado empregando NaOH 1 M ou HCl 1 M.
- Passar para o balão volumétrico e avolumar até a marca de aferição.
- Pipetar 25 mL, passar para um béquer e adicionar 50 mL (pipetados) de água. Obteve-se assim o volume correspondente ao que se padronizou para o meio reacional.
- Pipetar um volume e adicionar em tubo de centrífuga com TCA 0,3 M. O volume pipetado e o volume de TCA no tubo de centrífuga foram iguais aos volumes previstos para o ensaio de hidrólise correspondente.
- Centrifugar a 5000 rpm por 20 minutos.

O sobrenadante constituiu-se no branco, que foi empregado nas determinações de absorbância correspondentes aos ensaios de hidrólise.

Para cada preparação da dispersão do extrato elaborou-se o branco conforme este procedimento.

3.12 Cálculos referentes aos ensaios para determinação da atividade e da cinética de hidrólise

Observe-se que, como será visto a seguir, ao se descontar as concentrações dos resíduos referentes à bromelina e a caseína obtém-se a concentração de aminoácidos aromáticos formados na hidrólise, o que

efetivamente reflete a ação enzimática. Estes resíduos estão presentes desde o início dos ensaios; ao diluir-se em TCA 0,3 M para precipitar as proteínas eles também são diluídos e contribuem para a leitura de absorbância. Esta contribuição fica anulada quando considera-se a diluição nos cálculos e subtraímos os valores previamente determinados destes resíduos.

As rotinas de cálculo para atividade e cinética foram similares, variando em função da fonte da enzima.

3.12.1 Cálculos para atividade e cinética envolvendo a bromelina pura

Nos ensaios com a bromelina pura levou-se em consideração que o branco utilizado foi água. Portanto, nos cálculos foram subtraídas as concentrações residuais, encontradas na enzima e na caseína. Desta forma, partindo-se da equação (3.9) tem-se a equação (3.10) que calcula a concentração de aminoácidos aromáticos formados na reação.

$$C_{\text{meio reacional bromelina pura}} = \frac{V_{\text{tubo}}}{V_{\text{meio reacional}}} \left(\frac{\alpha_{\text{tubo}} - D}{B} \right) - C_{\text{resíduo bromelina}} - C_{\text{resíduo caseína}} \quad (3.10)$$

onde $C_{\text{meio reacional bromelina pura}}$ é a concentração $\left(\frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right)$ de aminoácidos aromáticos, expressos em tirosina, formados na reação de hidrólise nos ensaios com bromelina pura, $C_{\text{resíduo bromelina}}$ e $C_{\text{resíduo caseína}}$ é a concentração, expressa em tirosina $\left(\frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right)$, do detectável a 280 nm após solubilização e precipitação, para a bromelina pura e para a caseína, respectivamente.

Para o cálculo da velocidade inicial da reação nos ensaios com bromelina pura, construiu-se o gráfico de $C_{\text{meio reacional bromelina pura}}$ em função do tempo. Para o cálculo da atividade enzimática calculou-se $C_{\text{meio reacional bromelina pura}}$ após 10 minutos de reação, como mostra a equação (3.11).

$$A_{\text{bromelina pura}} = \frac{\left(C_{\text{meio reacional bromelina pura}} \right)_{10}}{10 \text{ minutos}} \quad (3.11)$$

onde $A_{\text{bromelina pura}}$ é a atividade enzimática $\left(\frac{\text{mmol}}{\text{L minuto}} \right)$ da bromelina pura, e

$\left(C_{\text{meio reacional bromelina pura}} \right)_{10}$ é a concentração do meio após 10 minutos de reação.

3.12.2 Cálculos para atividade e cinética envolvendo o extrato

Para os ensaios com o extrato o branco foi elaborado para cada caso, considerando a presença de substâncias que apresentam absorvância a 280 nm. Portanto, nos cálculos subtraiu-se a absorvância do branco (α_{branco}) da absorvância do tubo (α_{tubo}), e a concentração residual encontrada na caseína. Desta forma, partindo-se da equação (3.9) tem-se a equação (3.12) que calcula a concentração de aminoácidos aromáticos formados na reação.

$$C_{\text{meio reacional extrato}} = \frac{V_{\text{tubo}}}{V_{\text{meio reacional}}} \left(\frac{(\alpha_{\text{tubo}}) - (\alpha_{\text{branco}}) - D}{B} \right) - C_{\text{resíduo caseína}} \quad (3.12)$$

onde $C_{\text{meio reacional extrato}}$ é a concentração $\left(\frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right)$ de aminoácidos aromáticos,

expressos em tirosina, formados na reação de hidrólise nos ensaios com extrato, e

$C_{\text{resíduo caseína}}$ é a concentração, expressa em tirosina $\left(\frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right)$, do detectável a 280 nm

após solubilização e precipitação, para a caseína.

Para o cálculo da velocidade inicial da reação nos ensaios com o extrato, construiu-se o gráfico de $C_{\text{meio reacional extrato}}$ em função do tempo. Para o cálculo da

atividade enzimática calculou-se $C_{\text{meio reacional extrato}}$ após 10 minutos de reação, como

mostra a equação (3.13).

$$A_{\text{extrato}} = \frac{\left(C_{\text{meio reacional extrato}} \right)_{10}}{10 \text{ minutos}} \quad (3.13)$$

onde A_{extrato} é a atividade enzimática $\left(\frac{\text{mmol}}{\text{L minuto}} \right)$ do extrato, e $\left(C_{\text{meio reacional extrato}} \right)_{10}$ é a concentração do meio após 10 minutos de reação.

3.13 Planejamento experimental

Foi efetuado o planejamento experimental, desenhado com base nos fundamentos encontrados em BARROS NETO, SCARMINIO & BRUNS (2002), com o objetivo de verificar as melhores condições, ou seja, condições de maior atividade enzimática, para execução dos ensaios para determinar a estabilidade térmica da enzima, e também a cinética da hidrólise. O planejamento consistiu em determinar a atividade enzimática variando o pH e a temperatura, mantendo-se fixas as concentrações de bromelina e de caseína para as relações enzima / substrato estudadas.

Para a determinação da atividade a rotina dos ensaios seguiu o descrito no item 3.2. De modo a permitir o acerto do pH previsto no planejamento, prepararam-se as dispersões inicialmente um pouco mais concentradas, conforme segue:

Dispersão de caseína:

- Preparar uma dispersão 25 g / L, conforme descrito no item 3.3.
- Pipetar 40 mL da dispersão, passar para um béquer e acertar o pH.
- Passar para um balão volumétrico e avolumar para 50 mL, obtendo-se uma dispersão 20 g / L (concentração utilizada em todos os ensaios do planejamento) no pH previsto pelo planejamento.

Dispersão de bromelina pura:

- Preparar, conforme descrito no item 3.4, uma dispersão: 2,6667 g / L

(referente à relação 1 enzima / 25 substrato), ou 1,3333 g / L (referente à relação 1 enzima / 50 substrato), ou 0,5334 g / L (referente à relação 1 enzima / 125 substrato).

- Pipetar 15 mL da dispersão, passar para um béquer e acertar o pH.
- Passar para um balão volumétrico e avolumar para 25 mL obtendo-se, respectivamente, soluções 1,6 g / L, 0,8 g / L e 0,32 g / L.

Dispersão do extrato:

- Preparar, seguindo a rotina para a bromelina pura, uma dispersão de extrato 1,6667 vez mais concentrada que aquela determinada conforme o item 3.7.1.
- Pipetar 15 mL da dispersão, passar para um béquer e acertar o pH.
- Passar para um balão volumétrico e avolumar para 25 mL, obtendo-se a dispersão com a quantidade de extrato calculada (item 3.7.1).
- Para o branco, pipetar 15 mL da dispersão inicial e avolumar para 75 mL.

3.13.1 Modelo quadrático

O objetivo foi determinar uma superfície de resposta que indicasse o valor do pH e da temperatura para os quais a atividade enzimática fosse máxima. Para tanto, considerou-se o modelo quadrático com seis parâmetros, isto é, variação do pH e da temperatura com as concentrações de enzima e de substrato fixas, como mostra a equação (3.14).

$$A = b_0 + b_1 pH_{cd} + b_2 t_{cd} + b_{11} pH_{cd}^2 + b_{22} t_{cd}^2 + b_{12} pH_{cd} t_{cd} \quad (3.14)$$

onde A é a atividade, t_{cd} é a temperatura codificada, pH_{cd} é o pH codificado, $b_0, b_1, b_2, b_{11}, b_{22}$ e b_{12} são constantes a serem determinadas pelo tratamento matemático adequado. Para atender ao modelo foi desenhado um planejamento em estrela, conforme mostra a Figura 3.12.

O ponto central foi temperatura de 35 °C e pH igual a 7,0. Estes valores

foram adotados com base no que é citado na literatura apresentada no capítulo 2 do presente trabalho (calculou-se a média aritmética dos valores de pH e de temperatura citados nas diversas publicações e os resultados tomados apenas como orientação para estabelecer o ponto central).

Considerando o ponto central ($t_{cd} = 0$, e $pH_{cd} = 0$) os valores codificados para o pH e para a temperatura foram calculados como segue:

$$pH_{cd} = \frac{pH - 7,0}{1} \quad (3.15)$$

$$t_{cd} = \frac{t - 35,0}{10} \quad (3.16)$$

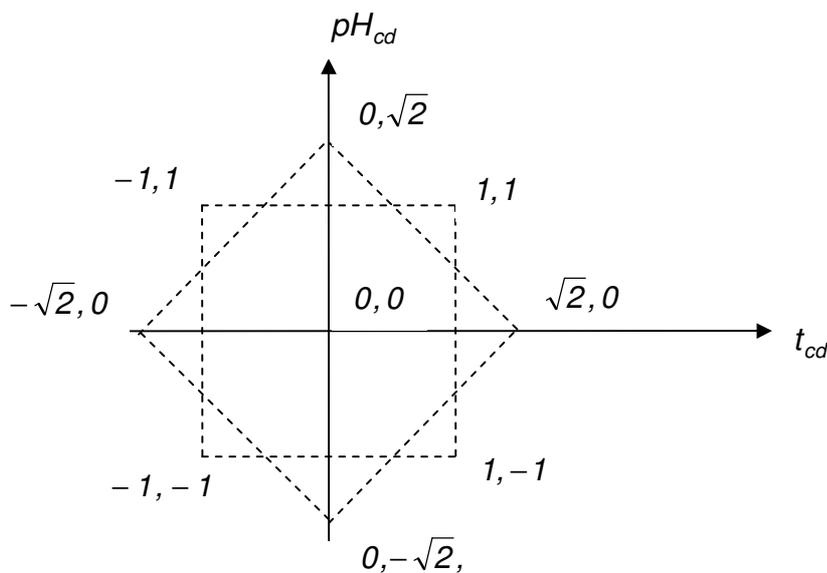


Figura 3.12 – Planejamento em estrela.

Assim, os valores de pH_{cd} e de t_{cd} foram $\sqrt{2}$, 1 , 0 , -1 e $-\sqrt{2}$. Pela Figura 3.12, observa-se que o planejamento prevê nove ensaios. Considerando duas repetições para o ponto central (para estimar o erro experimental), o total de ensaios foi de onze. A Tabela 3.1 mostra o conjunto de ensaios com os valores da temperatura e do pH codificados previstos no planejamento, e os valores do pH e da temperatura para os ensaios (calculados pelas equações 3.15 e 3.16).

A atividade enzimática foi medida para cada ensaio previsto no planejamento, o qual foi efetuado para a enzima pura e para o extrato do fruto, nas relações enzima / substrato estudadas.

Tabela 3.1 – Conjunto de ensaios previstos no planejamento

Número de ensaios	pH_{cd}	t_{cd}	Valores para os ensaios ²	
			pH	t (°C)
1	0	$-\sqrt{2}$	7,0	20,9
1	-1	-1	6,0	25,0
1	1	-1	8,0	25,0
1	$-\sqrt{2}$	0	5,6	35,0
3	0	0	7,0	35,0
1	$\sqrt{2}$	0	8,4	35,0
1	-1	1	6,0	45,0
1	1	1	8,0	45,0
1	0	$\sqrt{2}$	7,0	49,1

3.13.2 Tratamento dos resultados do planejamento

A determinação das constantes da equação (3.14) foi feita considerando as matrizes mostradas na Figura 3.13. Na Tabela 3.2 tem-se as referências com relação a matriz \mathbf{X} . A matriz \mathbf{Y} refere-se às atividades $A_{i,j}$ encontradas nos ensaios: o índice “i” refere-se ao pH_{cd} e o índice “j” refere-se a t_{cd} (observar a correspondência dos índices da atividade com as linhas das colunas 2 e 3).

$$\mathbf{b} = (\mathbf{X}^{transp} \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^{transp} \mathbf{Y} \quad (3.17)$$

Para obter o valor das constantes calcula-se a matriz \mathbf{b} conforme a

² Os valores calculados foram aproximados até décimos. Para os ensaios, o pH foi acertado tendo como meta o valor calculado, uma vez que o pHmetro permitiu leitura com esta precisão; com relação à temperatura aproximou-se até o valor inteiro, uma vez que o termômetro utilizado foi de mercúrio com graduação de 1 °C.

equação (3.17), onde o sobrescrito *transp* indica matriz transposta e o índice -1 a matriz inversa. A matriz **b**, cuja coluna é composta pelas constantes da equação (3.14), é mostrada na Figura 3.14.

$$\mathbf{X} = \begin{vmatrix} 1 & -1 & -1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & -1 & 1 & 1 & -1 \\ 1 & -1 & 1 & 1 & 1 & -1 \\ 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & -\sqrt{2} & 0 & 2 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & \sqrt{2} & 0 & 2 & 0 \\ 1 & \sqrt{2} & 0 & 2 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & -\sqrt{2} & 0 & 2 & 0 \end{vmatrix} \quad \mathbf{Y} = \begin{vmatrix} A_{-1,-1} \\ A_{1,-1} \\ A_{-1,1} \\ A_{1,1} \\ A_{0,0} \\ A_{0,0} \\ A_{0,0} \\ A_{-\sqrt{2},0} \\ A_{0,\sqrt{2}} \\ A_{\sqrt{2},0} \\ A_{0,-\sqrt{2}} \end{vmatrix}$$

Figura 3.13 – Matrizes para o cálculo das constantes da equação (3.14).³

Os valores de atividade encontrados no planejamento experimental foram tratados empregando a equação (3.17). Os cálculos foram efetuados pelo aplicativo computacional MINITAB 15 da Minitab Inc. Este aplicativo forneceu os valores da matriz **b** (Figura 3.14) que contem as constantes da equação (3.14), acompanhadas da probabilidade com a qual pode-se analisá-las estatisticamente. A Tabela 3.3 mostra como os resultados foram apresentados.

Tabela 3.2 – Referências com relação a matriz **X**

Coluna	Relativa ao termo:
1	constante
2	pH_{cd}
3	t_{cd}
4	pH_{cd}^2
5	t_{cd}^2
6	$pH_{cd} t_{cd}$

³ Observar que para a construção das colunas 4 e 5 eleva-se, respectivamente, as colunas 2 e 3 ao quadrado; e para a construção da coluna 6 multiplica-se a coluna 2 pela coluna 3.

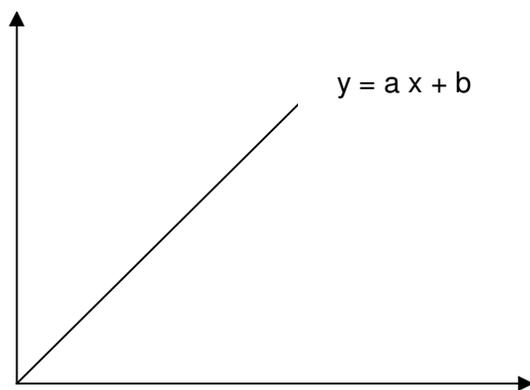
$$\mathbf{b} = \begin{pmatrix} b_0 \\ b_1 \\ b_2 \\ b_{11} \\ b_{22} \\ b_{12} \end{pmatrix}$$

Figura 3.14 – Matriz \mathbf{b} , com os valores das constantes da equação (3.14).

Tabela 3.3 – Coeficientes de regressão para a atividade

Termo	Coeficiente	P (probabilidade)
Constante	b_0	P b_0
pH_{cd}	b_1	P b_1
t_{cd}	b_2	P b_2
pH_{cd}^2	b_{11}	P b_{11}
t_{cd}^2	b_{22}	P b_{22}
$pH_{cd} \cdot t_{cd}$	b_{12}	P b_{12}

y (valores de atividade previstos pelo modelo)



x (valores de atividade experimentais)

Figura 3.15 – Gráfico para verificar o ajuste do modelo quadrático aos resultados experimentais do planejamento.

Para a análise considera-se um nível de significância. Se, por exemplo, o nível for de 95 %, para os coeficientes que tiverem o valor de P menor do que 0,05

descarta-se a hipótese de não haver correlação no nível de significância considerado. Em outras palavras, os coeficientes que apresentaram valor de P maiores do que 0,05 não são considerados significativos. Entretanto, para este trabalho admitiram-se todos os parâmetros como significativos, portanto, não excluídos da equação do modelo quadrático (equação 3.14).

Para verificar o ajuste com os resultados experimentais construiu-se um gráfico dos valores de atividade previstos pelo modelo em função dos valores de atividade experimentais. A Figura 3.15 ilustra este gráfico.

Além de esperar-se que o coeficiente de correlação seja próximo de 1, quanto mais representativo for o modelo, mais o valor de “a” deverá ser próximo de 1 e o valor de “b” próximo de zero.

Tabela 3.4 – Soma quadrática das fontes de variação ⁴.

Fonte de variação	Soma quadrática (SQ)
Regressão	$SQ_R = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$
Resíduos	$SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$
Erro puro	$SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$
Total	$SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$

Outra abordagem feita para verificar quanto o modelo (equação 3.14) explica os resultados experimentais foi a análise de variância envolvendo a soma quadrática de três fontes de variação (considerando todos os parâmetros do modelo): a regressão, os resíduos e o erro puro. A Tabela 3.4 mostra como estes valores foram calculados, empregando o aplicativo computacional MINITAB 15. A

⁴ n_i = número de repetições no nível i ; m = número de níveis distintos da variável independente; y_{ij} = j -ésima resposta observada no i -ésimo ensaio; \hat{y}_i = valor previsto pelo modelo para o ponto i ; \bar{y}_i = média das respostas observadas no nível i ; \bar{y} = média global. (BARROS NETO, SCARMINIO & BRUNS, 2002).

equação (3.18) relaciona três somas quadráticas: SQ_T (soma quadrática em torno da média), SQ_R (soma quadrática devido à regressão) e SQ_r (soma quadrática residual).

$$SQ_T = SQ_R + SQ_r \quad (3.18)$$

A equação (3.19) calcula o coeficiente de determinação do modelo (R^2). Quanto mais próximo de 1 for o valor de R^2 , melhor o ajuste do modelo aos resultados experimentais. O valor de R^2 multiplicado por 100 indica a porcentagem de variação explicada.

$$R^2 = \frac{SQ_R}{SQ_T} \quad (3.19)$$

Com a soma quadrática do erro puro (SQ_{ep}), calculou-se a porcentagem máxima de variação explicável (equação 3.20).

$$\text{variação explicável máxima} = \frac{SQ_T - SQ_{ep}}{SQ_T} \quad (3.20)$$

3.14 Estabilidade térmica da enzima

Conforme já citado no item 2.7, as enzimas são moléculas sensíveis à ação térmica. Para verificar a estabilidade da bromelina pura e do extrato do fruto, elaborou-se uma série de ensaios para determinação da atividade enzimática sob diferentes temperaturas empregando a dispersão da caseína e da enzima elaboradas conforme citado nos itens 3.3, 3.4 e 3.7.2. Para estes ensaios tanto a caseína quanto a enzima foram aquecidas, tomando-se os cuidados citados no item 3.1.1, e colocadas separadas no banho termostático na temperatura desejada, permanecendo nesta condição durante todo o tempo previamente estabelecido.

O plano de ensaios utilizado para determinar a atividade considerou as seguintes temperaturas: 25, 35, 45, 55 e 65 °C. Quanto ao número de ensaios ao longo do tempo, para cada temperatura estabeleceu-se:

- Para bromelina pura: um ensaio no tempo zero e um ensaio a cada 20 minutos até 180 minutos, totalizando 10 ensaios.
- Para o extrato: um ensaio no tempo zero, um ensaio a cada 20 minutos até 80 minutos e um ensaio a cada 25 minutos até 180 minutos, totalizando 9 ensaios. Desta forma, o extrato correspondente a um ensaio foi empregado para determinação do branco na leitura da absorbância.

3.14.1 Cinética da decomposição térmica

A literatura refere-se à decomposição térmica da bromelina obedecendo a uma reação de primeira ordem (HAYASHI & IKADA, 1991; ARROYO-REYNA & HERNANDEZ – ARANA, 1995; SRIWATANAPONGSE, BALABAN & TEIXEIRA, 2000; LI & LIN, 2001; YODOYA et al., 2003). Assim, admitindo que a decomposição é elementar, pode-se escrever a equação (3.21).



onde k_i é a constante de velocidade da reação, ou constante de inativação, na temperatura considerada.

Se a velocidade da reação for representada por $r \left(\frac{\text{mol}}{\text{L minuto}} \right)$, tem-se a equação (3.22).

$$r = k_i C_E \quad (3.22)$$

onde a constante k_i é expressa em (minuto^{-1})

Partindo-se de um balanço molar geral para uma espécie química em um meio reacional tem-se a equação (3.23).

$$\left[\begin{array}{c} \text{taxa} \\ \text{de} \\ \text{acúmulo} \end{array} \right] = \left[\left[\begin{array}{c} \text{taxa} \\ \text{de} \\ \text{entrada} \end{array} \right] + \left[\begin{array}{c} \text{taxa} \\ \text{de} \\ \text{formação} \end{array} \right] \right] - \left[\left[\begin{array}{c} \text{taxa} \\ \text{de} \\ \text{saída} \end{array} \right] + \left[\begin{array}{c} \text{taxa} \\ \text{de} \\ \text{reação} \end{array} \right] \right] \quad (3.23)$$

onde a taxa tem unidade expressa em $\frac{\text{mol}}{\text{tempo}}$.

Aplicando-se o balanço para a bromelina, a taxa de formação é zero. Além disso, considerando que os ensaios foram efetuados em processo batelada, a taxa de entrada e a taxa de saída é zero. A taxa de reação é dada por $r.V$, onde V é o volume do meio reacional. Aplicando-se estas considerações na equação (3.23), resulta a equação (3.24).

$$\frac{dN_E}{d\theta} = -rV \quad (3.24)$$

onde N_E refere-se ao número de mols de enzima e θ é o tempo.

A reação de hidrólise ocorreu em fase líquida, portando V é constante. Desta forma, com base na equação (3.24), e também lembrando da equação (3.22), escreve-se a equação (3.25).

$$\frac{dC_E}{d\theta} = -k_i C_E \quad (3.25)$$

Desenvolvendo e integrando a equação (3.25) obtém-se a equação (3.26).

$$\ln \frac{C_E}{C_{E0}} = -k_i \theta \quad (3.26)$$

onde C_E e C_{E0} são as concentrações de enzima no tempo θ e no tempo zero de reação, respectivamente.

Nestes ensaios, a dispersão de bromelina ficou submetida à determinada temperatura durante todo o tempo previsto e, portanto, sofrendo decomposição. Como a atividade é uma medida direta da ação enzimática (equação 3.2), ela é proporcional à quantidade de enzima presente no momento do ensaio. Assim, pode-se considerar a atividade como uma medida indireta da concentração de enzima. Desta forma, a equação (3.26) pode ser expressa em termos da atividade, conforme mostra a equação (3.27).

$$\ln \frac{A}{A_0} = -k_i \theta \quad (3.27)$$

onde A e A_0 são as atividades nos tempos θ e zero, respectivamente.

Com o objetivo de verificar se o conjunto de resultados experimentais da

atividade, obtidos ao longo do tempo para cada temperatura, está de acordo com o modelo de decomposição de primeira ordem (equação 3.27), calculou-se $\left(-\ln\frac{A}{A_0}\right)$ e construiu-se o gráfico em função do tempo, conforme exemplifica a Figura 3.16.

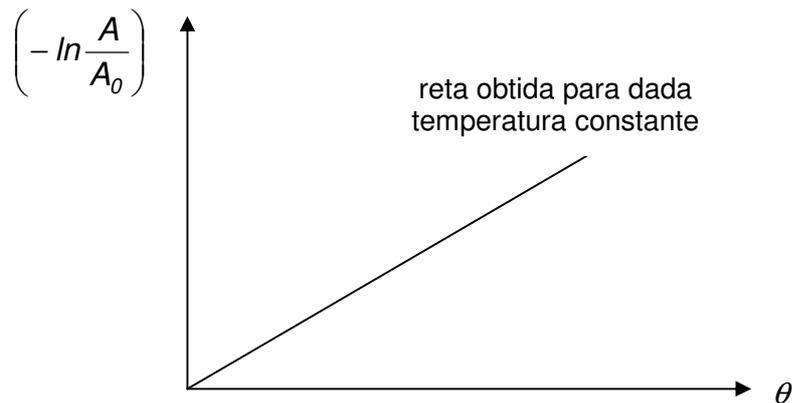


Figura 3.16 – Gráfico para verificação do ajuste ao modelo de primeira ordem na desativação térmica da bromelina.

Quanto mais os resultados experimentais se aproximarem da reta mostrada no gráfico da Figura 3.16, mais representativo é o modelo. Ainda, a inclinação da reta fornece o valor da constante de velocidade k_i para dada temperatura.

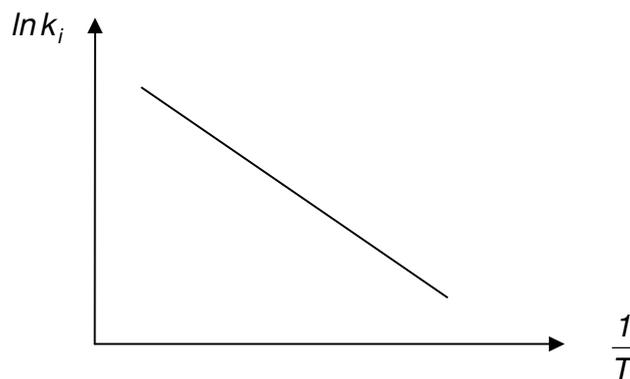


Figura 3.17 – Gráfico para verificação do ajuste ao modelo de Arrhenius da dependência de k_i com a temperatura.

Com base na literatura citada (item 2.7), a constante de velocidade varia com a temperatura conforme a equação de Arrhenius (equação 2.21). Esta

equação modificada resulta na equação (2.22)

$$\ln k_i = \ln k_0 - \frac{E_a}{RT} \quad (2.22)$$

Com os valores de k_i obtidos para diferentes temperaturas calculou-se $\ln k_i$ e construiu-se o gráfico em função de $\frac{1}{T}$, exemplificado na Figura 3.17.

Quanto mais os resultados experimentais se aproximarem da reta mostrada no gráfico da Figura (3.17), mais representativo é o modelo, e a inclinação da reta fornece o valor de $\frac{E_a}{R}$, com o qual pode-se calcular a energia de ativação da reação de decomposição da enzima. Pode-se ainda calcular o valor do fator de frequência k_0 .

3.15 Determinação da cinética da ação enzimática da bromelina

Um dos objetivos deste trabalho foi o estudo cinético da hidrólise enzimática da bromelina, nas relações enzima / substrato: 1 / 25, 1 / 50 e 1 / 125. Como já discutido no capítulo 2, a literatura faz referência a esta reação como sendo controlada pelo complexo formado entre a enzima e o substrato, como mostra a equação (2.5).

$$v = k_3 C_{ES} \quad (2.5)$$

Desenvolvendo para expressar a velocidade em função da concentração de substrato e arranjando adequadamente, chega-se à equação (2.15).

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max} C_S} \quad (2.15)$$

Com a equação (2.15) constrói-se o gráfico de Lineweaver - Burk, apresentado na Figura 2.1. Se os resultados experimentais apresentarem-se na forma prevista por este gráfico conclui-se que o modelo (Michaelis - Menten) é adequado.

A temperatura do meio reacional nos ensaios foi a do ponto central do planejamento experimental (35°C). O pH foi o de máxima atividade a 35 °C, encontrado após o tratamento dos resultados do planejamento experimental.

O método experimental para esta verificação consiste em determinar a velocidade inicial em várias concentrações de substrato. Mediu-se a velocidade pela formação de produtos (aminoácidos aromáticos expressos em tirosina), e a literatura (SEGEL, 1993) orienta que, neste caso, a velocidade é considerada inicial enquanto a variação da concentração de produtos é linear com o tempo, e não mais do que 5 % de substrato tenha sido consumido (de outra forma, a velocidade observada não mais corresponderia à concentração considerada). A concentração de produtos foi medida após 3, 6, 10 e 15 minutos de reação, e a velocidade foi calculada para o tempo zero. Para este cálculo construiu-se uma curva com os resultados experimentais ajustados ao modelo sigmoidal. Os cálculos foram efetuados empregando o aplicativo Microcal Origin 6.0. Este aplicativo ajusta os resultados experimentais ao modelo sigmoidal e calcula a derivada da função nos diversos tempos. Este procedimento tem sido utilizado em trabalhos envolvendo estudos sobre cinética, uma vez que produz um ajuste mais acurado, conforme se pode encontrar em DAMASCENO et al. (2008), RODRIGUES et al. (2003 e 2004) e MOCKAITIS et al. (2006).

As concentrações de caseína empregadas no preparo das dispersões foram aquelas constantes na primeira coluna da Tabela 3.5. Para o tratamento dos resultados a concentração no meio reacional foi calculada em mmol / L tomando a massa molecular da caseína de 23192 g / mol, valor encontrado em WALSTRA et al. (1999). A Tabela 3.5 mostra os valores das concentrações trabalhadas e seus inversos (L / mmol).

Pode-se observar na Tabela 3.5 que os inversos da concentração estão espaçados o mais igualmente possível, o que resulta no gráfico de $\frac{1}{v}$ em função de $\frac{1}{C_S}$ (gráfico da Figura 2.1) com melhor distribuição dos pontos experimentais. Neste procedimento procurou-se combinar o espaçamento dos inversos das concentrações com as concentrações no preparo das dispersões, de modo a

obter-se massas não muito fracionadas de caseína a serem pesadas.

Tabela 3.5 – Valores de concentração de caseína trabalhados.

No preparo da dispersão (g / L)	No meio reacional		
	g / L	mmol / L	L / mmol
20,00	13,3333	0,5749	1,7394
10,00	6,6667	0,2875	3,4783
6,15	4,1000	0,1768	5,6561
4,50	3,0000	0,1294	7,7280
3,50	2,3333	0,1006	9,9404
3,00	2,0000	0,0862	11,6009
2,50	1,6667	0,0719	13,9082
2,20	1,4667	0,0632	15,8228
2,00	1,3333	0,0575	17,3913

As dispersões foram preparadas individualmente na concentração correspondente, seguindo o procedimento anteriormente citado (item 3.3). Apesar de serem necessários 50 mL da dispersão de caseína, foram preparados 100 mL para o caso de eventual repetição. Evitou-se empregar o procedimento de diluições considerando que alguns valores de concentração só poderiam ser obtidos por este método após sucessivas operações, adicionando erro experimental.

4 Resultados e discussões

Os resultados obtidos estão apresentados e discutidos a seguir, envolvendo as curvas de calibração, as substâncias presentes na bromelina pura e na caseína que apresentam leitura a 280 nm (brancos), planejamentos experimentais, estabilidade térmica da enzima e cinética da hidrólise enzimática.

4.1 Curvas de calibração

Ao longo do trabalho foram efetuadas doze curvas de calibração para determinar a correspondência entre a absorvância e a concentração de tirosina. Elaboraram-se nove concentrações diferentes de tirosina, conforme descrito no Apêndice II. A concentração 2,5 mmol tirosina / L foi desconsiderada porque apresentou valor de absorvância fora da região linear.

Devido à necessidade de substituição da lâmpada do espectrofotômetro a calibração foi dividida em dois conjuntos: seis ensaios antes da substituição e seis após.

Na Tabela 4.1, apresentada no Apêndice III, encontram-se os resultados do primeiro conjunto de ensaios com as médias, desvios padrão e coeficientes de variação referentes às absorvâncias. Com os resultados apresentados na Tabela 4.1 construiu-se o gráfico da absorvância em função da concentração de tirosina, conforme mostra a Figura 4.1. Os valores considerados para absorvância foram os valores médios, uma vez que a variação entre eles foi pequena. No próprio gráfico da Figura 4.1 encontra-se a equação da reta, cujo coeficiente R^2 é bastante próximo de um, indicando boa correlação. Portanto, com base na equação da reta da Figura 4.1, estabeleceu-se a equação (4.1), que fornece a correspondência entre a concentração de tirosina $(C_{tir})_1$ e a absorvância para os primeiros seis ensaios de calibração.

$$(C_{tir})_1 = \frac{\alpha - 0,1107}{1,0501} \left(\frac{\text{mmol tirosina}}{\text{litro}} \right) \quad (4.1)$$

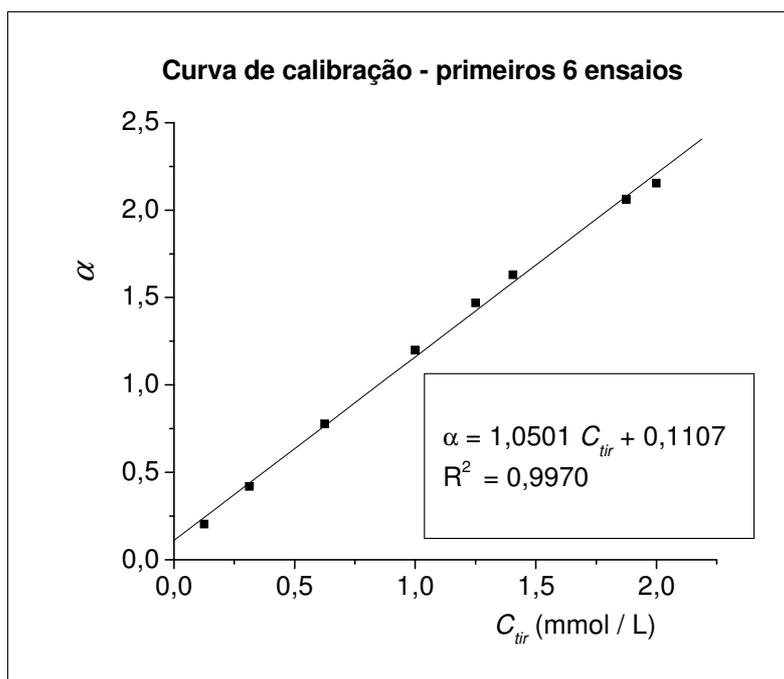


Figura 4.1 - Gráfico absorvância em função da concentração de tirosina: primeiros seis ensaios.

Para o conjunto complementar de seis ensaios seguiu-se a mesma rotina: na Tabela 4.2 (apresentada no Apêndice IV) encontram-se os resultados, com os quais construiu-se o gráfico (Figura 4.2).

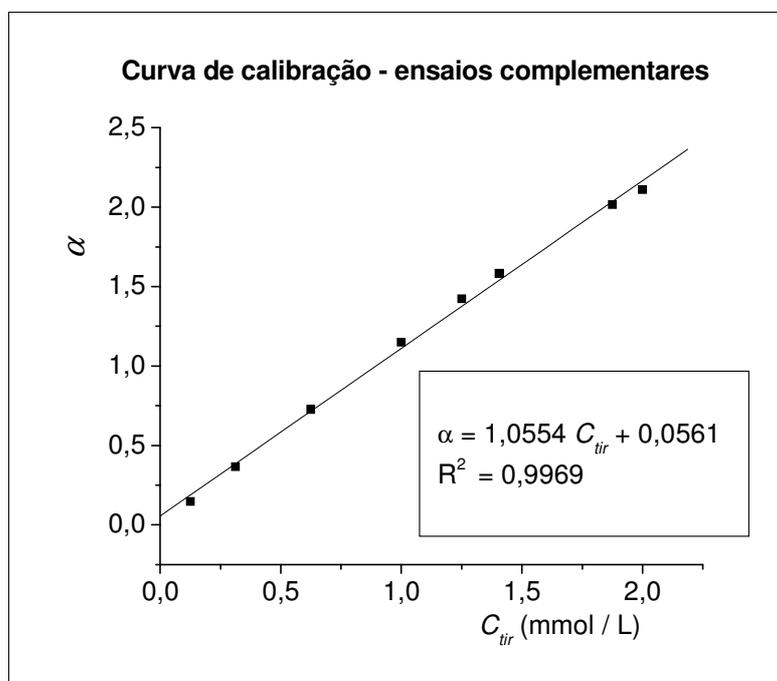


Figura 4.2 - Gráfico absorvância em função da concentração de tirosina: ensaios complementares.

Observa-se que o coeficiente R^2 é bastante próximo de um, indicando boa correlação. Com base na equação da reta da Figura 4.2 estabeleceu-se a equação (4.2), que fornece a correspondência entre a concentração de tirosina $(C_{tir})_2$ e a absorvância para os ensaios complementares de calibração.

$$(C_{tir})_2 = \frac{\alpha - 0,0561}{1,0554} \left(\frac{\text{mmol tirosina}}{\text{litro}} \right) \quad (4.2)$$

Para verificar se as curvas de calibração estão coerentes, em ordem de grandeza, com o previsto pela teoria, considerou-se a lei de Beer - Lambert:

$$\alpha = \varepsilon l C_{tir}$$

onde α é a absorvância, $\varepsilon \left(\frac{L}{\text{mmol cm}} \right)$ a absorvidade, $l (cm)$ o espaçamento interno da cubeta de quartzo, e $C_{tir} \left(\frac{\text{mmol}}{L} \right)$ a concentração de tirosina.

De acordo com KATS & St GERMAIN (2002) o valor da absorvidade para a tirosina é $1,2150 \frac{L}{\text{mmol cm}}$. O valor do espaçamento interno da cubeta de quartzo utilizada foi de 1 cm . Para efeito comparativo, a absorvância calculada pela lei de Beer - Lambert para a tirosina na concentração de $1,0000 \frac{\text{mmol}}{L}$ vale 1,2150, enquanto que o valor obtido pela curva de calibração relativa aos primeiros seis ensaios vale 1,1608, e o obtido para os ensaios complementares vale 1,1115.

4.2 Substâncias presentes na bromelina pura e na caseína, que apresentam leitura a 280 nm.

Após precipitação com TCA e centrifugação, tanto as dispersões de bromelina pura quanto as de caseína apresentaram leitura a 280 nm, indicando a presença de substâncias sensíveis a este comprimento de onda, e que não são frutos da hidrólise enzimática. Estes valores, expressos em mmol tirosina / L,

foram determinados para descontá-los nos cálculos da concentração de aminoácidos formados durante os ensaios.

Para a bromelina pura (lote 444431 / 1) foram preparadas 4 dispersões na concentração de 0,5333 g / L tamponadas em pH 7,0, que corresponde à concentração de bromelina presente no meio reacional de 75 mL para os ensaios com relação enzima / substrato de 1 / 25. Foram retirados 5 mL da dispersão e adicionados a 2 mL de TCA 0,3 M. Em seguida centrifugou-se por 20 minutos e retirou-se amostra para análise de absorbância. Os resultados encontram-se na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Material detectável a 280 nm presente na bromelina pura

Dispersão	Absorbância (α)	Média
1	0,1648	
2	0,1669	0,1647
3	0,1628	
4	0,1642	

Tomando como base a equação (3.9), pode-se expressar a presença de substâncias, na bromelina pura, em concentração de tirosina:

$$C_{\substack{\text{resíduo} \\ \text{bromelina} \\ 1/25}} = \frac{V_{\text{tubo}} \cdot \left(\frac{\alpha_{\text{tubo}} - D}{B} \right)}{V_{\text{dispersão}}} \left(\frac{\text{mmol tirosina}}{L} \right)$$

Obtém-se:

$$C_{\substack{\text{resíduo} \\ \text{bromelina} \\ 1/25}} = \frac{7 \cdot \left(\frac{0,1647 - 0,1107}{1,0501} \right)}{5} = 0,0720 \left(\frac{\text{mmol tirosina}}{L} \right)$$

Portanto, para os cálculos dos aminoácidos formados (expressos em mmol de tirosina / L) nas reações de hidrólise, envolvendo bromelina pura (na relação 1 / 25), deve-se subtrair o valor de $0,0720 \left(\frac{\text{mmol tirosina}}{L} \right)$.

Para os ensaios com relação enzima / substrato de 1 / 50 e 1 / 125, o valor subtraído deve ser proporcional, ou seja:

$$C_{\text{resíduo bromelina 1/50}} = 0,0360 \left(\frac{\text{mmol tirosina}}{L} \right)$$

$$C_{\text{resíduo bromelina 1/125}} = 0,0144 \left(\frac{\text{mmol tirosina}}{L} \right)$$

Para a caseína, onde a presença de material detectável a 280 nm é maior, e as concentrações nos ensaios de hidrólise variaram de 1,3333 a 13,3333 g / L, foram efetuadas determinações em três diferentes diluições. Decidiu-se fazer em diferentes diluições porque quando se utilizaram menores concentrações de caseína amostrou-se maior quantidade do meio reacional, e ao contrário para concentrações maiores. Esta variação foi necessária para produzir a leitura de absorbância mais próxima dos valores centrais da curva de calibração nos ensaios de hidrólise, onde são gerados aminoácidos.

Tabela 4.4 – Resíduo detectável a 280 nm presente na caseína.

Diluição	Dispersão	Caseína lote número:			
		78689		105320	
		Absorbância		Absorbância	
		leitura	média	leitura	média
5 mL da dispersão + 5 mL TCA 0,3 M	1	0,2177	0,2288	0,2064	0,2105
	2	0,2398		0,2146	
3 mL da dispersão + 6 mL TCA 0,3 M	1	0,1732	0,1836	0,1835	0,1898
	2	0,1940		0,1961	
5 mL da dispersão + 2 mL TCA 0,3 M	1	0,3139	0,3170	0,2412	0,2688
	2	0,3201		0,2964	

As dispersões foram preparadas na concentração de 13,3333 g / L e tamponadas em pH 7,0, que corresponde à concentração de caseína presente no meio reacional de 75 mL. Foram retiradas alíquotas da dispersão e adicionadas à

solução de TCA 0,3 M. Em seguida centrifugou-se por 20 minutos e retirou-se amostra para análise de absorbância. Os ensaios foram efetuados preparando-se duas dispersões para cada um dos dois lotes de caseína empregados no estudo (78689 e 105320). A Tabela 4.4 mostra as absorbâncias encontradas.

Com base a equação (3.9), a presença de substâncias detectáveis a 280 nm na caseína foi expressa em concentração de tirosina:

$$C_{\text{resíduo caseína}} = \frac{V_{\text{tubo}} \cdot \left(\frac{\alpha_{\text{tubo}} - D}{B} \right)}{V_{\text{dispersão}}} \left(\frac{\text{mmol tirosina}}{L} \right)$$

Como exemplo, para o primeiro valor referente ao lote 78689:

$$C_{\text{resíduo caseína lote 78689 5mL+5mL}} = \frac{10 \cdot \left(\frac{0,2288 - 0,1107}{1,0501} \right)}{5} = 0,2249 \left(\frac{\text{mmol tirosina}}{L} \right)$$

A Tabela 4.5 mostra os valores, em concentração de tirosina, dos resíduos detectáveis a 280 nm para os dois lotes de caseína. A Tabela 4.5 mostra também os valores médios, a serem descontados nos cálculos das substâncias formadas durante o processo de hidrólise.

Tabela 4.5 – Concentração, expressa em tirosina, de resíduos presentes na caseína.

Diluição	$C_{\text{resíduo caseína}} \left(\frac{\text{mmol tirosina}}{L} \right)$	
	Lote 78689	Lote 105320
5 mL da dispersão + 5 mL TCA 0,3 M	0,2249	0,1901
3 mL da dispersão + 6 mL TCA 0,3 M	0,2083	0,2260
	Valor médio: 0,2361	Valor médio: 0,2090
5 mL da dispersão + 2 mL TCA 0,3 M	0,2750	0,2108

Para concentrações de caseína menores do que 13,3333 g / L,

empregadas no estudo da cinética da hidrólise, os valores descontados foram proporcionais à concentração utilizada. Por exemplo, para concentração de 6,6667 g / L o valor descontado foi de 0,1181 mmol / L para o lote 78689, e de 0,1045 mmol / L para o lote 105320.

4.3 Planejamento experimental

O planejamento foi efetuado para cada relação enzima / substrato, tanto para a bromelina pura como para o extrato. Para o planejamento determinou-se a atividade enzimática em cada condição previamente definida na Tabela 3.1.

4.3.1 Planejamento experimental para bromelina pura

Foram empregadas três relações enzima / substrato: 1 / 25; 1 / 50 e 1 / 125. Para os ensaios foram adicionados, sob agitação, 25 mL da dispersão de bromelina sobre 50 mL da dispersão de caseína na concentração de 20 g / L. A temperatura e o pH foram ajustados para os valores previstos no planejamento. Foram retiradas alíquotas do meio reacional, adicionadas a um tubo de centrífuga contendo solução de TCA 0,3 M, seguindo-se centrifugação e retirada de amostra para leitura de absorbância. Com base na equação (3.10) foi calculada a concentração dos produtos da hidrólise expressos em mmol tirosina / L, após 10 minutos de reação.

$$\left(C_{\text{meio reacional bromelina pura}} \right)_{10} = \frac{V_{\text{tubo}}}{V_{\text{meio reacional}}} \left(\frac{\alpha_{\text{tubo}} - D}{B} \right) - C_{\text{resíduo bromelina}} - C_{\text{resíduo caseína}} \quad (3.10)$$

A atividade enzimática foi calculada com base na equação (3.11).

$$A_{\text{bromelina pura}} = \frac{\left(C_{\text{meio reacional bromelina pura}} \right)_{10}}{10 \text{ minutos}} \quad (3.11)$$

Como exemplo, o primeiro valor de atividade do planejamento para bromelina pura, relação 1 / 25, cuja absorbância encontrada foi 1,0112 e a diluição foi de 3 mL do meio reacional em 6 mL de solução TCA 0,3 M, foi calculado como

segue:

$$\left(C_{\text{meio reacional bromelina pura}} \right)_{10} = \frac{9}{3} \left(\frac{1,0112 - 0,1107}{1,0501} \right) - 0,0720 - 0,2361 = 2,2645 \left(\frac{\text{mmol tirosina}}{\text{L}} \right)$$

$$A_{\text{bromelina pura}} = \frac{2,2645 \left(\frac{\text{mmol tirosina}}{\text{L}} \right)}{10 \text{ minutos}} = 0,2265 \left(\frac{\text{mmol tirosina}}{\text{L} \cdot \text{minuto}} \right)$$

O cálculo para os demais valores, envolvendo os planejamentos experimentais para bromelina pura, seguiu a mesma rotina.

4.3.1.1 Planejamento experimental para bromelina pura: relação 1 / 25.

Os ensaios foram efetuados em duplicata. Os resultados encontrados para atividade em função das variáveis codificadas estão na Tabela 4.6, apresentada no Apêndice V. Os resultados foram tratados empregando o aplicativo computacional MINITAB 15 da Minitab Inc. A equação (4.3) mostra o modelo quadrático resultante, em função das variáveis codificadas.

$$Atividade_{\text{Bromelina pura}}^{1/25} = 0,3369 - 0,0299 pH_{cd} + 0,0653 t_{cd} - 0,0422 pH_{cd}^2 - 0,00845 t_{cd}^2 - 0,0205 pH_{cd} t_{cd} \quad (4.3)$$

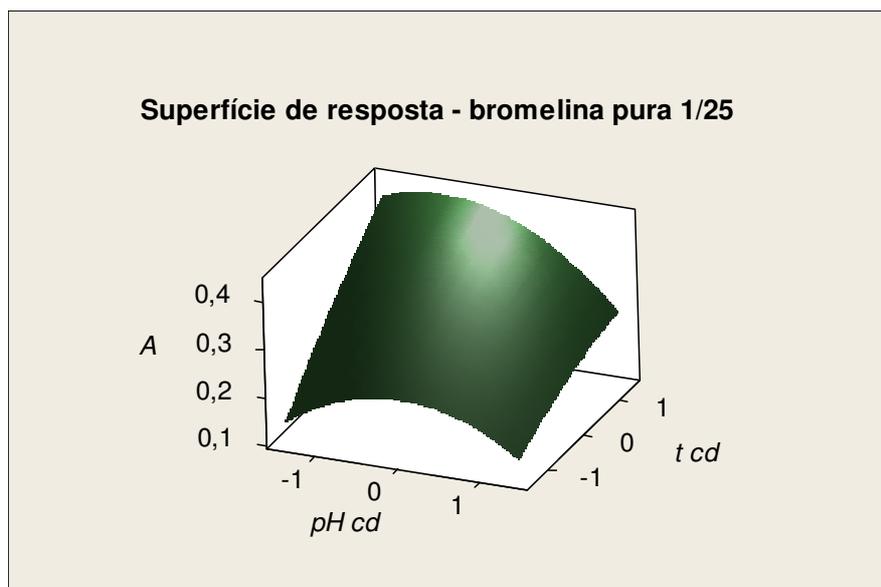


Figura 4.3 – Superfície de resposta para bromelina pura 1 / 25.

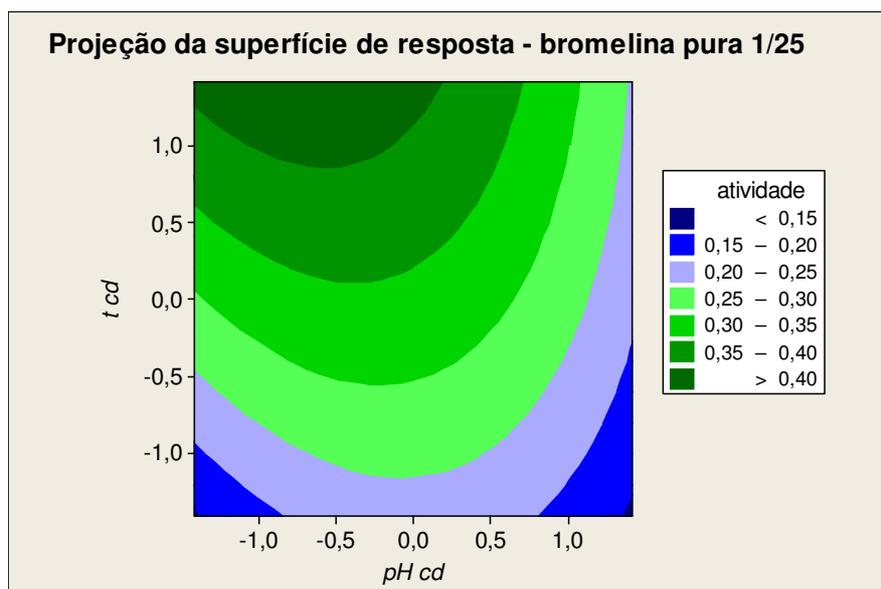


Figura 4.4 – Projecção da superfície de resposta para bromelina pura 1 / 25.

A superfície de resposta descrita pelo modelo é apresentada na Figura 4.3. A projecção da superfície de resposta sobre o plano formado pelos eixos temperatura codificada e pH codificado é apresentada na Figura 4.4.

A análise de variância levou aos resultados apresentados na Tabela 4.7. Com base nestes resultados calculou-se o coeficiente de determinação do modelo, dado pela equação (3.19) e a variação explicável máxima, dada pela equação (3.20).

Tabela 4.7 – Análise de variância - bromelina pura, relação 1 / 25.

Fonte de variação	Soma quadrática (SQ)	Valor encontrado
Regressão	$SQ_R = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	0,1048
Resíduos	$SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	0,0072
Erro puro	$SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	0,00587
Total	$SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	0,1120

Coeficiente de determinação do modelo:

$$R^2 = \frac{SQ_R}{SQ_T} = \frac{0,1048}{0,1120} = 0,9357$$

Significa que 93,57 % da variação é explicada pelo modelo.

Varição explicável máxima:

$$\frac{SQ_T - SQ_{ep}}{SQ_T} = \frac{0,1120 - 0,00587}{0,1120} = 0,9476$$

A variação explicável máxima do modelo é de 94,76 %.

O ajuste aos resultados experimentais foi verificado construindo-se um gráfico dos valores de atividade previstos pelo modelo em função dos valores encontrados experimentalmente, conforme mostra a Figura 4.5.

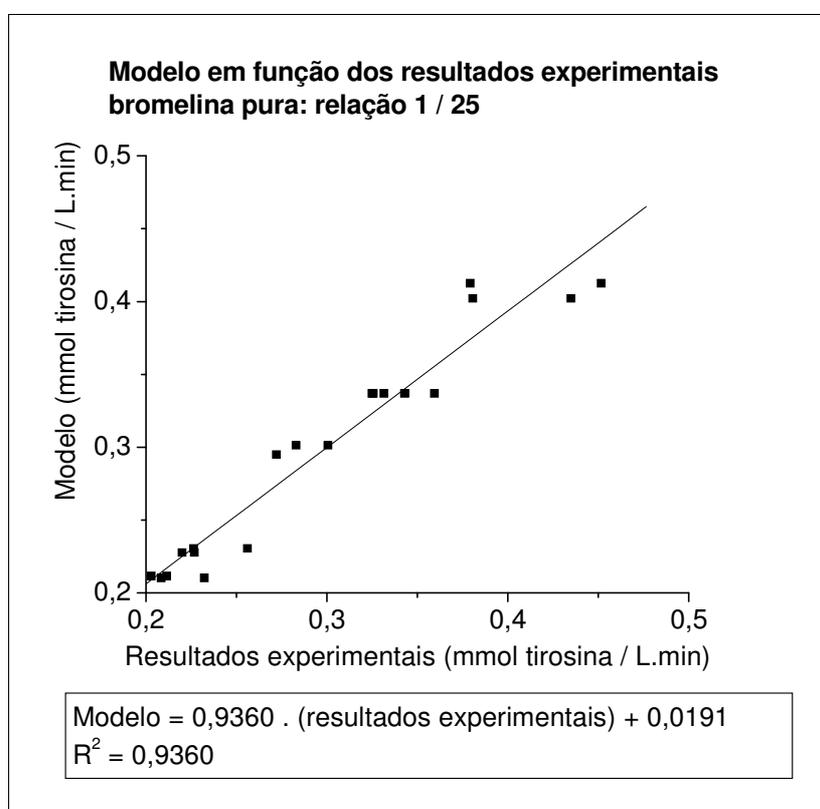


Figura 4.5 – Gráfico comparativo para o modelo bromelina pura relação 1 / 25.

O coeficiente de determinação do modelo, a variação explicável máxima e o gráfico da Figura 4.5 mostram que a equação (4.3) é satisfatória para expressar como a atividade enzimática varia em função da temperatura e do pH (dentro dos limites do planejamento tipo estrela, nos quais os ensaios foram efetuados).

Na Figura 4.3 observa-se que, para uma temperatura codificada constante, um plano paralelo ao plano definido pelos eixos atividade e pH

codificado corta a superfície de resposta, definindo uma curva da atividade em função do pH codificado. Derivando a equação do modelo (equação 4.3) com relação ao pH codificado, para dada temperatura codificada constante tem-se:

$$\left(\frac{d(\text{atividade})}{d \text{pH}} \right)_{t_{cd} \text{ constante}} = -0,0299 - 0,0844 \text{pH}_{cd} - 0,0205 t_{cd} \quad (4.4)$$

A equação (4.4) é a derivada da curva definida pela intersecção do plano acima referido. Igualando a equação derivada a zero tem-se o ponto de máximo da função. Ponto de máximo porque a segunda derivada é negativa; também porque a simples observação da Figura 4.3 mostra que o ponto é de máximo:

$$-0,0299 - 0,0844 \text{pH}_{cd} - 0,0205 t_{cd} = 0$$

$$\text{pH}_{cd \text{ ótimo}}^{\text{bromelina pura 1 / 25}} = -0,3547 - 0,2425 t_{cd} \quad (4.5)$$

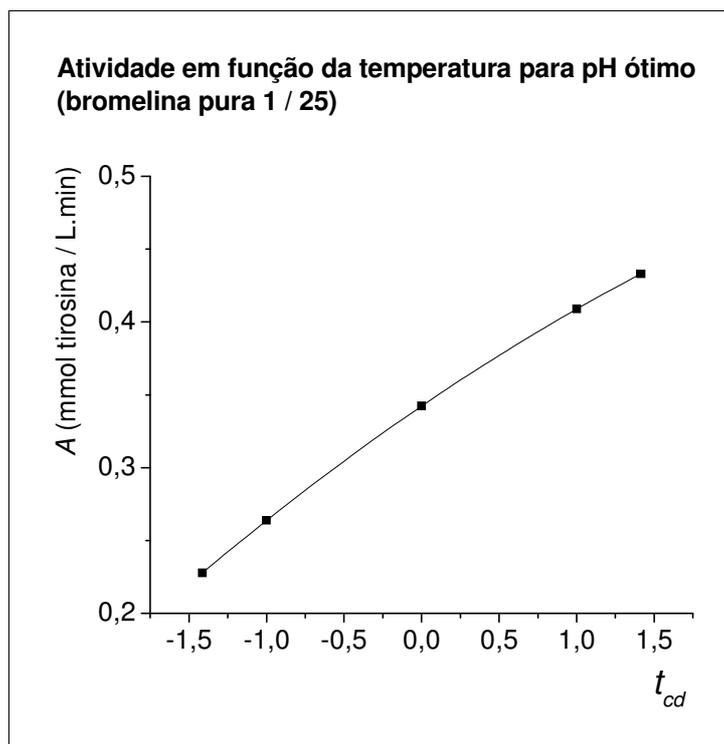


Figura 4.6 – Gráfico da atividade para pH ótimo em função da temperatura codificada – bromelina pura 1 / 25.

A equação (4.5) define o pH ótimo, para dada temperatura, no qual deve-se trabalhar para que se obtenha a maior atividade enzimática da bromelina pura

para a relação 1 / 25. Para os ensaios relativos a estabilidade térmica e cinética enzimática, utilizou-se a equação (4.5) para definir o pH.

Substituindo a equação (4.5) na equação do modelo (equação 4.3), tem-se a equação (4.6), que relaciona a atividade enzimática para pH codificado ótimo em função da temperatura codificada.

$$\text{Atividade}_{\text{pH}_{cd} \text{ ótimo}}^{\text{bromelina pura 1 / 25}} = 0,3423 + 0,0726 t_{cd} - 0,0060 t_{cd}^2 \quad (4.6)$$

A Figura 4.6 mostra o gráfico da atividade para pH ótimo em função da temperatura codificada (equação 4.6).

4.3.1.2 Planejamento experimental para bromelina pura: relação 1 / 50.

Para esta relação enzima / substrato aplicou-se o mesmo tratamento apresentado para a relação 1 / 25. Os ensaios também foram efetuados em duplicata, e os resultados encontrados para atividade em função das variáveis codificadas estão na Tabela 4.8, apresentada no Apêndice VI. Trataram-se os resultados empregando o aplicativo computacional MINITAB 15 da Minitab Inc, cujo modelo quadrático resultante, em função das variáveis codificadas, é apresentado na equação (4.7).

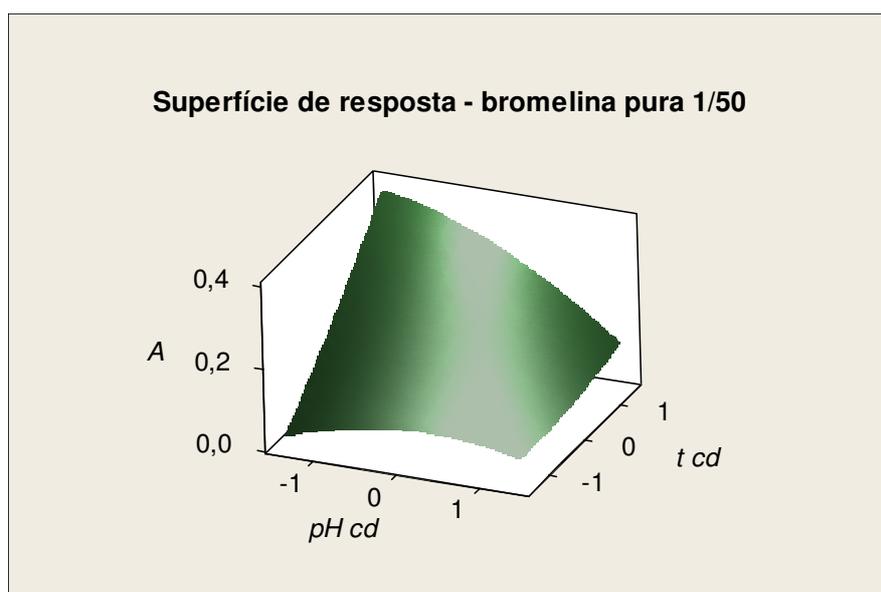


Figura 4.7 – Superfície de resposta para bromelina pura 1/50.

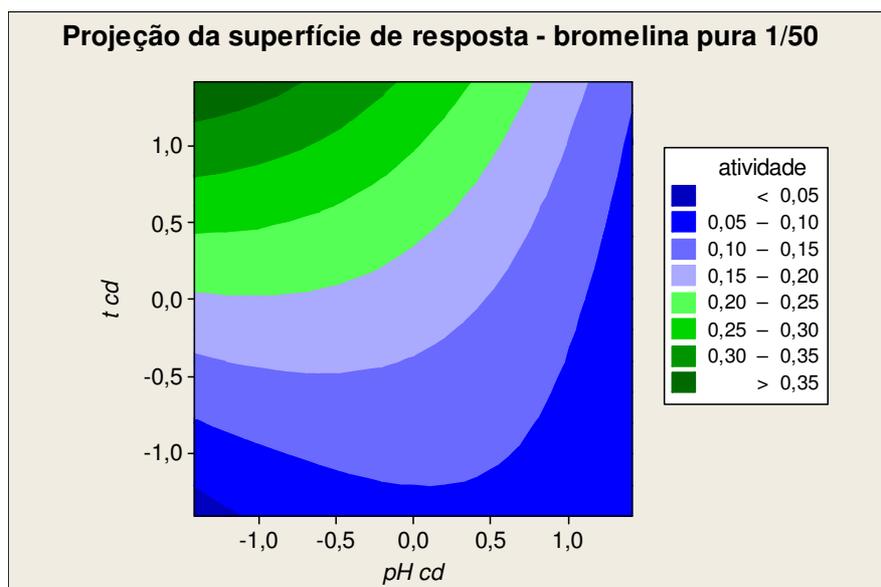


Figura 4.8 – Projecção da superfície de resposta para bromelina pura 1/50.

$$\begin{aligned}
 \text{Atividade}_{\text{Bromelina pura}} = 0,1748 - 0,0439 \text{ pH}_{cd} + 0,0708 t_{cd} - 0,0215 \text{ pH}_{cd}^2 \\
 \text{1/50} + 0,00733 t_{cd}^2 - 0,0397 \text{ pH}_{cd} t_{cd} \quad (4.7)
 \end{aligned}$$

A superfície de resposta descrita pelo modelo é apresentada na Figura 4.7, e a projecção da superfície de resposta sobre o plano formado pelos eixos temperatura codificada e pH codificado é apresentada na Figura 4.8.

Tabela 4.9 – Análise de variância - bromelina pura, relação 1 / 50.

Fonte de variação	Soma quadrática (SQ)	Valor encontrado
Regressão	$SQ_R = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	0,1311
Resíduos	$SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	0,00098
Erro puro	$SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	0,00013
Total	$SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	0,1321

A análise de variância levou aos resultados apresentados na Tabela 4.9. Com base nestes resultados calculou-se o coeficiente de determinação do modelo, dado pela equação (3.19), e a variação explicável máxima, dada pela

equação (3.20).

Coeficiente de determinação do modelo:

$$R^2 = \frac{SQ_R}{SQ_T} = \frac{0,1311}{0,1321} = 0,9924$$

Significa que 99,24 % da variação é explicada pelo modelo.

Variação explicável máxima:

$$\frac{SQ_T - SQ_{ep}}{SQ_T} = \frac{0,1321 - 0,00013}{0,1321} = 0,9990$$

A variação explicável máxima do modelo é de 99,90 %.

Verificou-se o ajuste aos resultados experimentais construindo um gráfico dos valores de atividade previstos pelo modelo em função dos valores encontrados experimentalmente, conforme mostra a Figura 4.9.

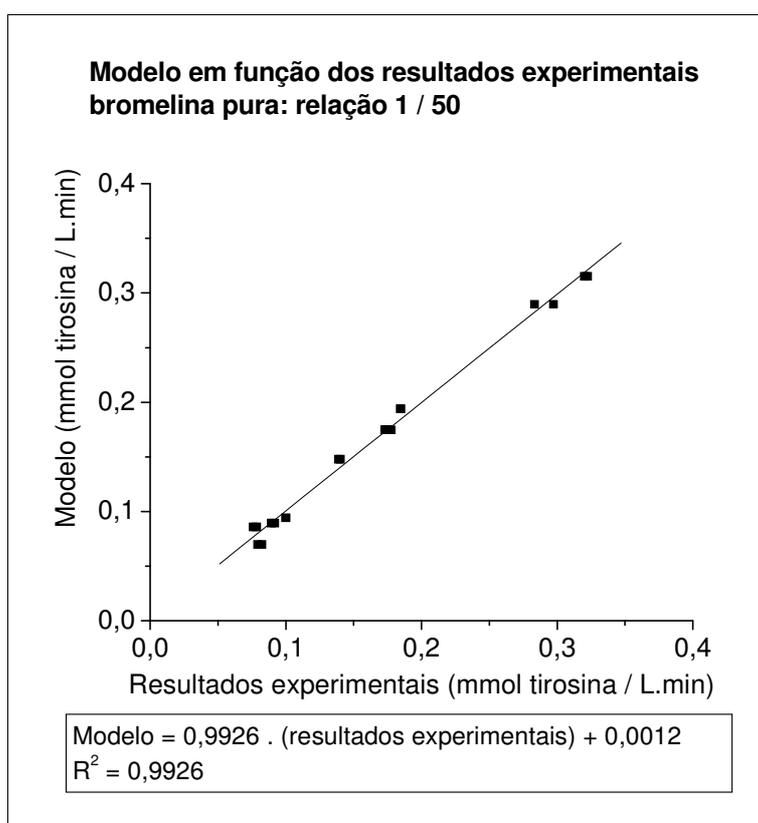


Figura 4.9 – Gráfico comparativo para o modelo bromelina pura relação 1 / 50.

O coeficiente de determinação do modelo, a variação explicável máxima e

o gráfico da Figura 4.9 mostram que a equação (4.7) é satisfatória para expressar como a atividade enzimática varia em função da temperatura e do pH (dentro dos limites do planejamento tipo estrela, nos quais os ensaios foram efetuados).

A exemplo do procedimento feito no item 4.3.1.1, a equação (4.8) é a derivada da curva definida pela intersecção do plano paralelo ao plano definido pelos eixos atividade e pH codificado, que corta a superfície de resposta (Figura 4.7). Igualando a equação derivada a zero, tem-se o ponto de máximo da função.

$$\left(\frac{d(\text{atividade})}{d \text{pH}} \right)_{t_{cd} \text{ constante}} = -0,0439 - 0,0430 \text{pH}_{cd} - 0,0397 t_{cd} \quad (4.8)$$

$$-0,0439 - 0,0430 \text{pH}_{cd} - 0,0397 t_{cd} = 0$$

$$\text{pH}_{cd \text{ ótimo}}^{\text{bromelina pura 1 / 50}} = -1,0210 - 0,9230 t_{cd} \quad (4.9)$$

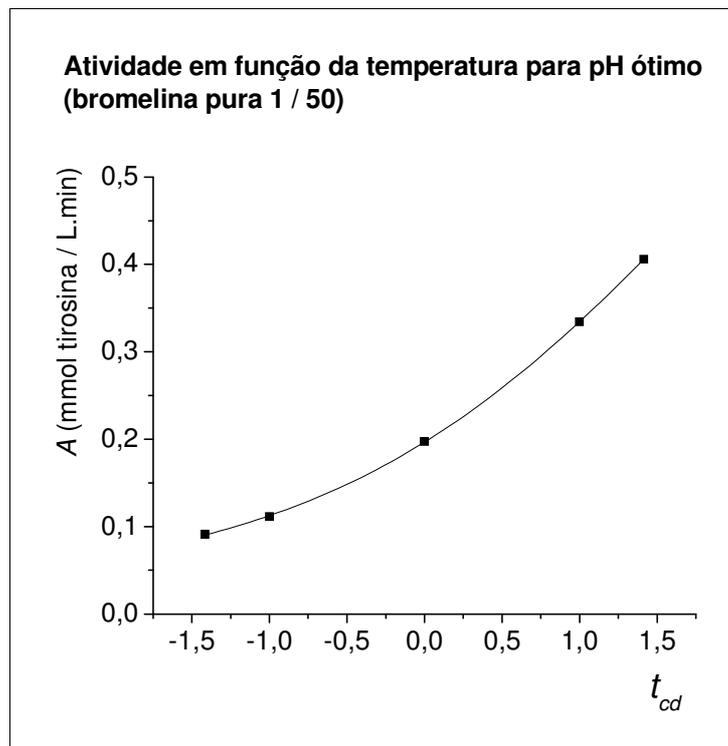


Figura 4.10 – Gráfico da atividade para pH ótimo em função da temperatura codificada – bromelina pura 1 / 50.

A equação (4.9) define o pH ótimo, para dada temperatura, no qual deve-se trabalhar para que se obtenha a maior atividade enzimática da bromelina pura

para a relação 1 / 50. Para os ensaios relativos a cinética enzimática, utilizou-se a equação (4.9) para definir o pH.

A equação (4.9) substituída na equação do modelo (equação 4.7), fornece a equação (4.10), que relaciona a atividade enzimática para pH codificado ótimo em função da temperatura codificada.

$$\text{Atividade}_{\text{pH}_{cd} \text{ ótimo}}^{\text{bromelina pura 1 / 50}} = 0,1972 + 0,1113 t_{cd} + 0,0257 t_{cd}^2 \quad (4.10)$$

A Figura 4.10 mostra o gráfico da atividade para pH ótimo em função da temperatura codificada (equação 4.10).

4.3.1.3 Planejamento experimental para bromelina pura: relação 1 / 125.

Para a relação enzima / substrato 1 / 125 o procedimento foi o mesmo utilizado nas relações anteriores. Os resultados encontrados para atividade em função das variáveis codificadas estão na Tabela 4.10, mostrada no Apêndice VII.

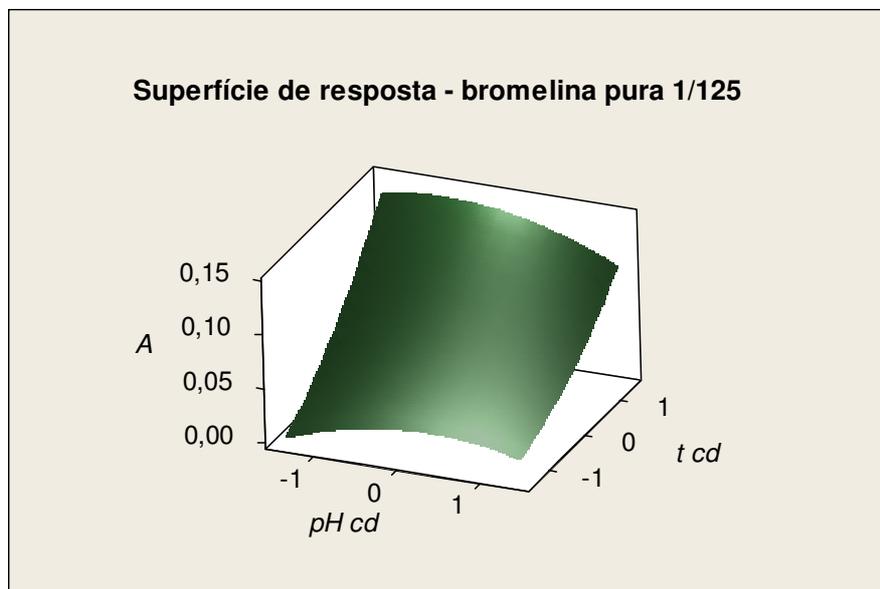


Figura 4.11 – Superfície de resposta para bromelina pura 1/125.

A equação (4.11) mostra o modelo quadrático resultante, em função das variáveis codificadas.

$$\begin{aligned} \text{Atividade}_{\text{Bromelina pura}}^{1/125} = & 0,0690 - 0,0038 \text{ pH}_{cd} + 0,0396 t_{cd} - 0,0087 \text{ pH}_{cd}^2 \\ & + 0,0069 t_{cd}^2 - 0,0061 \text{ pH}_{cd} t_{cd} \end{aligned} \quad (4.11)$$

A superfície de resposta descrita pelo modelo é apresentada na Figura 4.11, e a sua projeção na Figura 4.12. A análise de variância levou aos resultados apresentados na Tabela 4.11, e com base nestes resultados calculou-se o coeficiente de determinação do modelo.

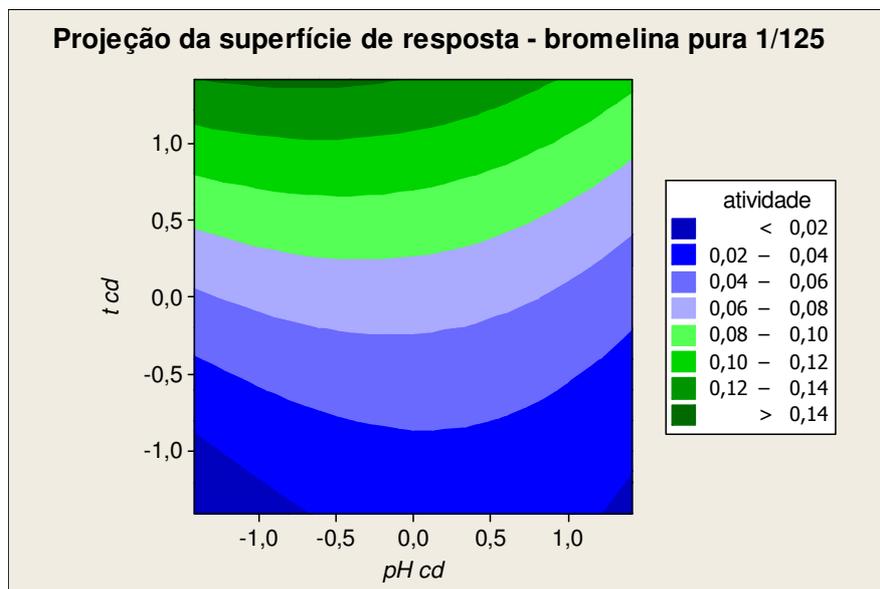


Figura 4.12 – Projeção da superfície de resposta para bromelina pura 1/125.

Tabela 4.11 – Análise de variância - bromelina pura, relação 1 / 125.

Fonte de variação	Soma quadrática (SQ)	Valor encontrado
Regressão	$SQ_R = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	0,0275
Resíduos	$SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	0,0012
Erro puro	$SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	0,0011
Total	$SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	0,0287

Coeficiente de determinação do modelo:

$$R^2 = \frac{SQ_R}{SQ_T} = \frac{0,0275}{0,0287} = 0,9582$$

Significa que 95,82 % da variação é explicada pelo modelo.

Variação explicável máxima:

$$\frac{SQ_T - SQ_{ep}}{SQ_T} = \frac{0,0287 - 0,0011}{0,0287} = 0,9617$$

A variação explicável máxima do modelo é de 96,17 %.

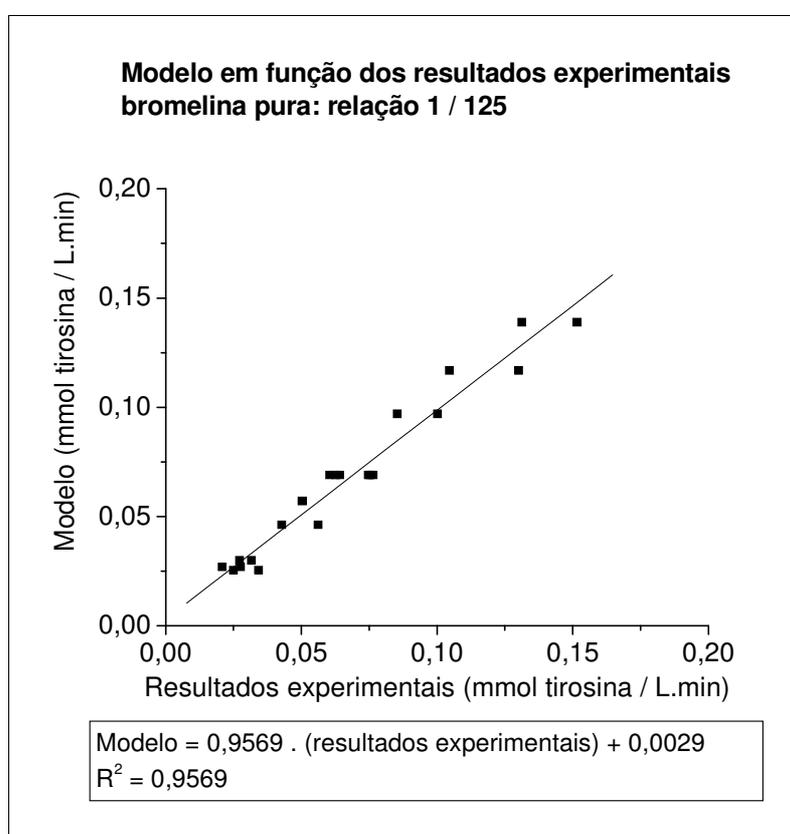


Figura 4.13 – Gráfico comparativo para o modelo bromelina pura relação 1 / 125.

O ajuste aos resultados experimentais foi verificado construindo-se o gráfico conforme mostra a Figura 4.13. O coeficiente de determinação do modelo, a variação explicável máxima e o gráfico da Figura 4.13 mostram que a equação (4.11) é satisfatória para expressar como a atividade enzimática varia em função da temperatura e do pH (dentro dos limites do planejamento tipo estrela, nos quais os ensaios foram efetuados).

Derivando a equação do modelo (equação 4.11) com relação ao pH codificado, para dada temperatura codificada constante tem-se:

$$\left(\frac{d(\text{atividade})}{d \text{pH}} \right)_{t_{cd} \text{ constante}} = -0,0038 - 0,0174 \text{pH}_{cd} - 0,0061 t_{cd} \quad (4.12)$$

Calculando o ponto de máximo da função:

$$-0,0038 - 0,0174 \text{pH}_{cd} - 0,0061 t_{cd} = 0$$

$$\text{pH}_{cd \text{ ótimo}}^{\text{bromelina pura 1 / 125}} = -0,2213 - 0,3512 t_{cd} \quad (4.13)$$

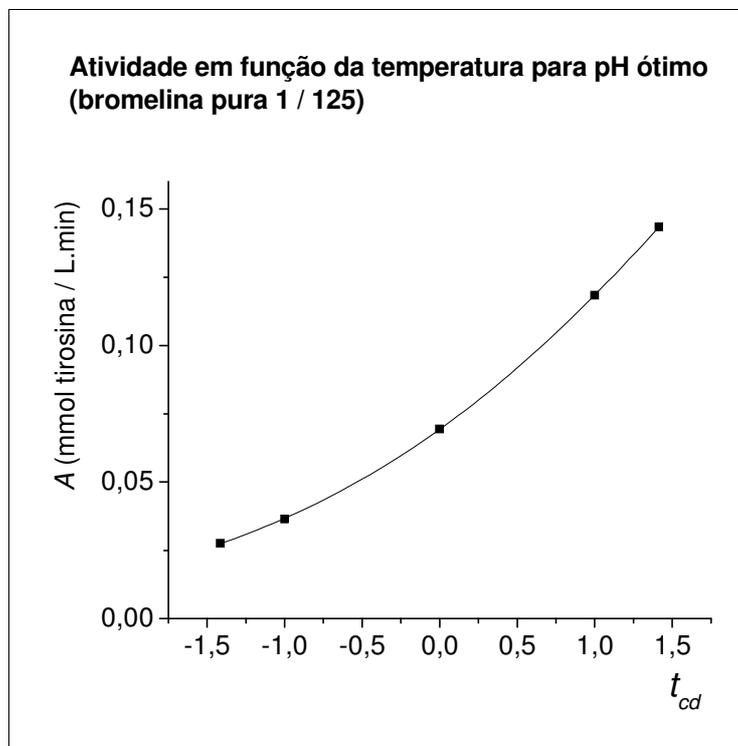


Figura 4.14 – Gráfico da atividade para pH ótimo em função da temperatura codificada – bromelina pura 1 / 125.

Substituindo a equação (4.13) na equação do modelo (equação 4.11), tem-se a equação (4.14), que relaciona a atividade enzimática para pH codificado ótimo em função da temperatura codificada.

$$\text{Atividade}_{\text{pH}_{cd \text{ ótimo}}^{\text{bromelina pura 1 / 125}}} = 0,0694 + 0,0409 t_{cd} + 0,0080 t_{cd}^2 \quad (4.14)$$

A Figura 4.14 mostra o gráfico da atividade para pH ótimo em função da temperatura codificada (equação 4.14).

4.3.1.4 Comparativo entre as relações enzima / substrato para a bromelina pura

A Figura 4.15 mostra o gráfico da atividade para pH ótimo em função da temperatura para as três relações bromelina pura / caseína.

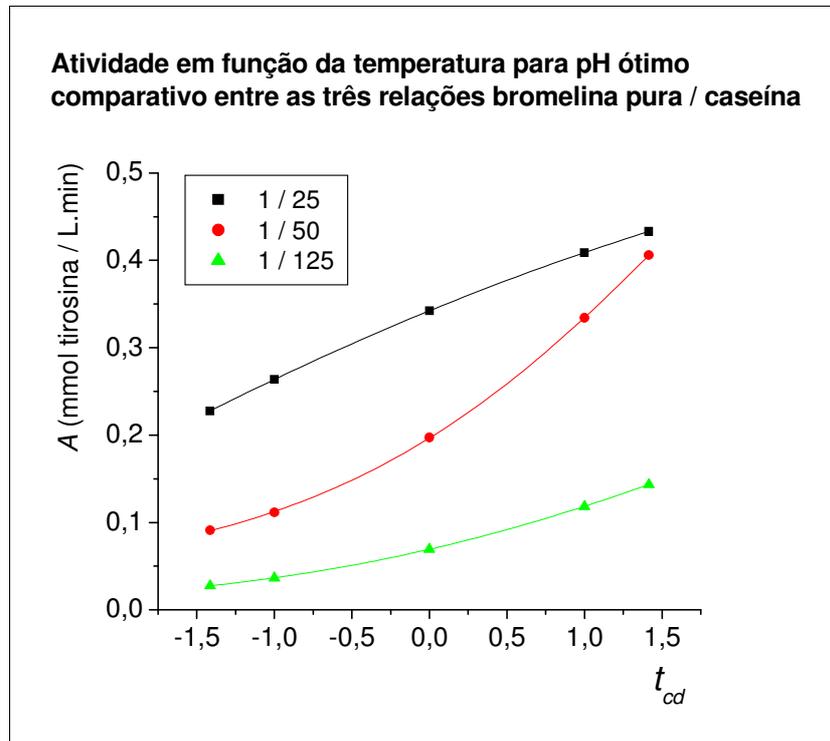


Figura 4.15 – Comparativo entre as três relações bromelina pura / caseína.

Tomando como referência, para as três relações, o ponto central da temperatura, ou seja, o ponto onde a temperatura codificada é igual a zero, segue que:

$$\text{Atividade}_{\text{pH}_{cd} \text{ ótimo}}^{\text{bromelina pura 1/25}} = 0,3423 + 0,0726 t_{cd} - 0,0060 t_{cd}^2 \quad (4.6)$$

Para $t_{cd} = 0$:

$$\text{Atividade}_{\text{pH}_{cd} \text{ ótimo}}^{\text{bromelina pura 1/25}} = 0,3423 \quad (4.15)$$

Fazendo o mesmo para as outras duas relações:

$$\text{Atividade}_{\text{pH}_{cd} \text{ ótimo}}^{\text{bromelina pura 1/50}} = 0,1972 \quad (4.16)$$

$$Atividade_{\text{pH}_{cd} \text{ ótimo}}^{\text{bromelina pura 1 / 125}} = 0,0694 \quad (4.17)$$

Dividindo a equação (4.15) pela equação (4.16):

$$\frac{Atividade_{\text{pH}_{cd} \text{ ótimo}}^{\text{bromelina pura 1 / 25}}}{Atividade_{\text{pH}_{cd} \text{ ótimo}}^{\text{bromelina pura 1 / 50}}} = \frac{0,3423}{0,1972} = 1,7358 \quad (4.18)$$

Dividindo a equação (4.15) pela equação (4.17):

$$\frac{Atividade_{\text{pH}_{cd} \text{ ótimo}}^{\text{bromelina pura 1 / 25}}}{Atividade_{\text{pH}_{cd} \text{ ótimo}}^{\text{bromelina pura 1 / 125}}} = \frac{0,3423}{0,0694} = 4,9323 \quad (4.19)$$

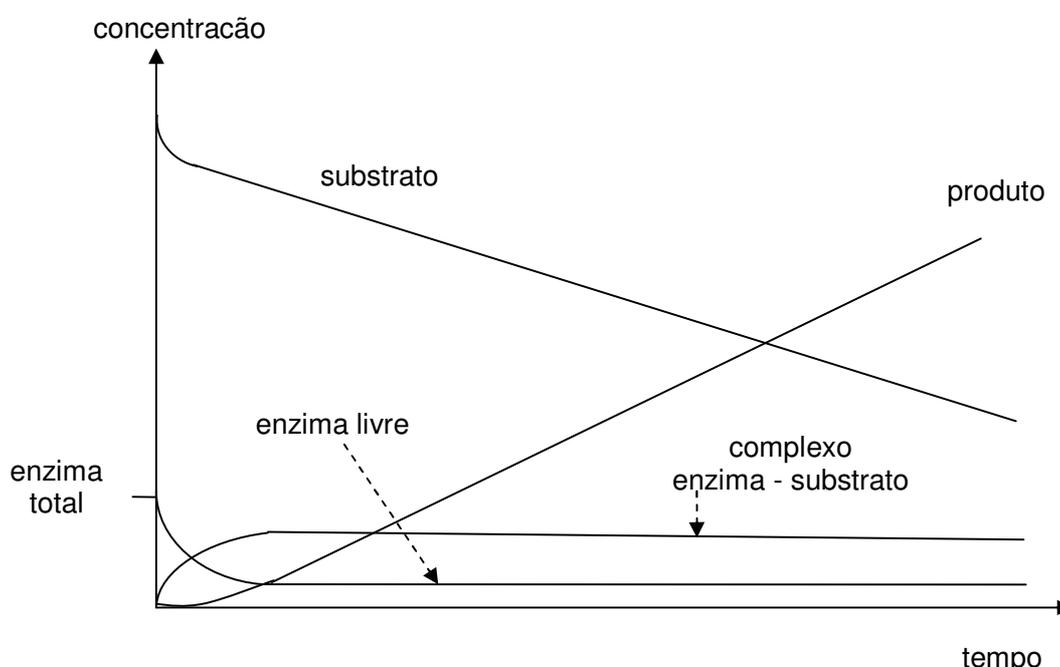
Pode-se observar que os quocientes estão próximos dos valores esperados, ou seja, atividade perto da metade para relação 1 / 50 quando comparada com a relação 1 / 25 e perto de cinco vezes menor para a relação 1 / 125 quando comparada com a relação 1 / 25, o que corresponde às proporções de enzima empregadas; lembrando que a concentração de substrato foi igual nos três casos (13,3333 g caseína / L). Cabe ressaltar que o objetivo principal não foi obter metade e um quinto da atividade da relação 1 / 25, mas sim efetuar o planejamento em três diferentes relações.

A Figura 4.15 mostra que a atividade aumenta com o aumento da temperatura, o que é esperado, uma vez que as constantes de velocidade das reações aumentam com ela. Entretanto, para a relação 1 / 25 nota-se que esta tendência não é tão acentuada. Observando a equação (4.6), o termo t_{cd}^2 apresenta sinal negativo, indicando que a curva deve apresentar um ponto de máximo, após o qual a atividade deve diminuir com a temperatura. A superfície de resposta para bromelina pura relação 1 / 25 (Figura 4.3) mostra esta tendência. Para as outras duas relações enzima / substrato o termo t_{cd}^2 é positivo, indicando comportamento diferente do observado para a relação 1 / 25, como pode-se observar na Figura 4.7 (superfície de resposta para bromelina pura 1/50) e na Figura 4.11 (superfície de resposta para bromelina pura 1/125).

Apesar dos modelos matemáticos das superfícies de resposta serem

restritos aos limites ensaiados, para a temperatura pode-se fazer alguma previsão para valores maiores, com base no fenômeno conhecido para o processo enzimático, ou seja, aumento da atividade com a temperatura em conjunto com a perda da atividade pela decomposição térmica da enzima. Assim, a tendência apresentada pela relação 1 / 25 pode ser explicada pela desativação térmica da enzima (por um lado, atividade aumenta com a temperatura, enquanto que por outro lado diminui pela desativação térmica). Os ensaios referentes à estabilidade térmica da bromelina pura, relação 1 / 25, discutidos mais à frente no item 4.4.1, mostram a perda de atividade enzimática com a temperatura. Para as outras duas relações enzima / substrato o fenômeno deve acontecer em temperaturas maiores do que aquela ensaiada ($t_{cd} > +\sqrt{2}$, ou seja: $t > 49^\circ\text{C}$).

A discussão sobre o comportamento para a relação 1 / 25 em comparação com as outras relações encontra apoio quando se considera o modelo de ação enzimática pseudo-estacionário (SEGEL, 1993). Neste modelo, a maior parte da enzima combina-se com o substrato formando um complexo intermediário, restando a presença de enzima livre. A Figura 4.16 mostra este comportamento.



Fonte: adaptado de SEGEL (1993).

Figura 4.16 – Concentrações ao longo do tempo: estado pseudo-estacionário.

Uma vez que a concentração de substrato foi a mesma para as três relações estudadas, a enzima livre está presente em menor quantidade nos ensaios referentes à relação 1 / 50 e 1 / 125, do que nos ensaios referentes à relação 1 / 25. Como para a relação 1 / 25 observa-se a tendência da atividade não aumentar com a temperatura da mesma forma como ocorre para as outras relações pode-se entender que a enzima, combinada com o substrato (complexo enzima-substrato) é menos suscetível à desativação térmica. Em outras palavras, a enzima livre é mais suscetível à desativação térmica do que quando combinada com o substrato e, por estar presente em maior quantidade na relação enzima / substrato 1 / 25, o gráfico da atividade em função da temperatura mostra uma taxa de aumento decrescente. Estas considerações encontram apoio no trabalho de KO & KANG (1990), conforme citado no item 2.7.

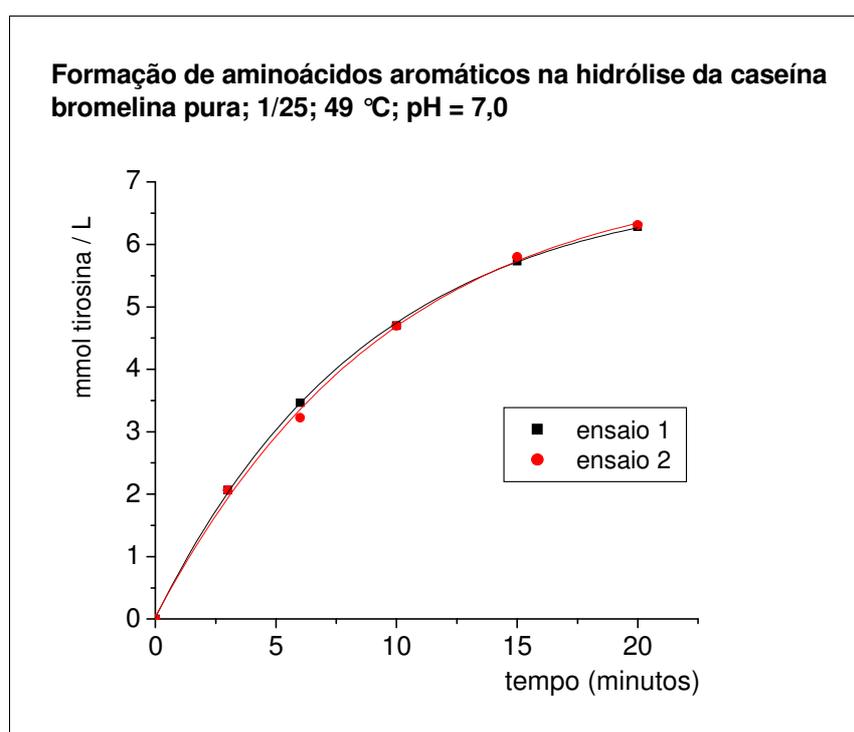


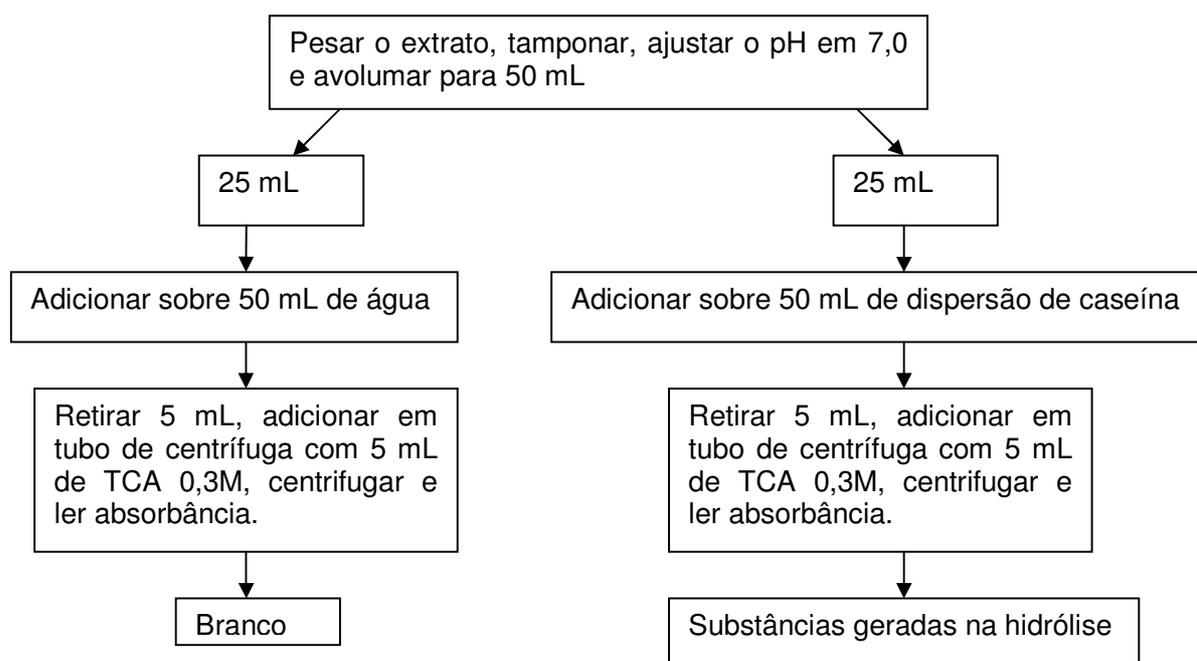
Figura 4.17 – Formação de aminoácidos aromáticos na hidrólise da caseína.(bromelina pura 1 / 25; 49 °C e pH 7,0).

Ainda nesta discussão, resta considerar se a taxa de aumento decrescente da atividade, observada para a relação 1 / 25, não seria devido à caseína ter sido já quase que totalmente consumida, isto é, nas condições do planejamento experimental na temperatura de 49 °C ($t_{cd} = +\sqrt{2}$), os 10 minutos

de tempo de teste da atividade terem sido suficientes para hidrolisar a caseína quase que totalmente, o que resultaria na atividade decrescente pela falta de substrato, e não pela desativação térmica da enzima. Para dirimir esta dúvida, foram realizados dois ensaios no ponto de maior temperatura previsto pelo planejamento experimental ($\text{pH} = 7,0$ e temperatura $49\text{ }^{\circ}\text{C}$), avaliando a quantidade de aminoácidos aromáticos resultantes da hidrólise da caseína ao longo de 20 minutos, cujos resultados encontram-se na Figura 4.17. O gráfico da Figura 4.17 mostra que em 10 minutos de reação a caseína não foi totalmente consumida restando quantidade apreciável, significando que as concentrações do complexo enzima - substrato e da enzima livre correspondem à região do patamar mostrado na Figura 4.16 (estado pseudo-estacionário). Conclui-se então que a taxa de aumento decrescente da atividade observada para a relação 1 / 25 não se deve à falta de substrato.

4.3.2 Planejamento experimental para o extrato da casca e do talo do abacaxi

A rotina para determinação da quantidade de extrato e ser empregada nos ensaios foi:



Como não se determinou a quantidade de enzima presente no fruto, para o abacaxi foram empregadas quantidades de extrato de modo que a atividade enzimática ficasse próxima daquela correspondente à relação enzima / substrato 1 / 25; 1 / 50 ou 1 / 125. Para tanto, foram efetuados ensaios prévios de atividade em função da quantidade de extrato. Para estes ensaios tomou-se o ponto central como referência, ou seja, pH em 7,0 e temperatura de 35 °C.

Os cálculos foram efetuados com base nas equações (3.12) e (3.13).

$$\left(C_{\text{meio reacional extrato}} \right)_{10} = \frac{V_{\text{tubo}}}{V_{\text{meio reacional}}} \left(\frac{(\alpha_{\text{tubo}}) - (\alpha_{\text{branco}}) - B}{A} \right) - C_{\text{resíduo caseína}} \quad (3.12)$$

$$A_{\text{extrato}} = \frac{\left(C_{\text{meio reacional extrato}} \right)_{10}}{10 \text{ minutos}} \quad (3.13)$$

Observações para a relação enzima / substrato de 1 / 25:

- 1) Para reproduzir esta relação, a quantidade de extrato ficou acima de 20 g. Neste caso, o volume de extrato adicionado foi de 50 mL, e a dispersão de caseína, preparada na concentração de 40 g / L, foi de 25 mL. Assim a concentração de caseína no meio reacional permaneceu no valor de 13,3333 g / L.
- 2) A quantidade de substâncias detectáveis a 280 nm presentes no extrato excedeu o limite de leitura. Portanto, foi necessário fazer uma diluição adicional das alíquotas retiradas tanto do branco quanto do ensaio com caseína: avolumou-se a alíquota retirada de 5 mL para 25 mL. Assim, no cálculo da concentração dos aminoácidos formados na hidrólise, expressos em mmol de tirosina / L, o quociente $\frac{V_{\text{tubo}}}{V_{\text{meio reacional}}}$ foi multiplicado por 5.

Como exemplo, para 40 gramas de extrato, a absorbância do branco foi de 0,9416 e do tubo foi de 1,5127. Assim:

$$\left(C_{\substack{\text{meio} \\ \text{reacional} \\ \text{extrato}}} \right)_{10} = 5 \frac{10}{5} \left(\frac{(1,5127 - 0,9416) - 0,0561}{1,0554} \right) - 0,2090 = 4,6707 \frac{\text{mmol tirosina}}{\text{L}}$$

$$A_{\text{extrato}} = \frac{4,6707}{10 \text{ minutos}} = 0,4671 \frac{\text{mmol tirosina}}{\text{L minuto}}$$

Para cada conjunto de ensaios a quantidade de extrato foi previamente determinada procurando reproduzir a atividade correspondente à relação bromelina pura / caseína em questão, tomando como referência o ponto central do planejamento experimental. O cálculo empregado foi uma relação linear; por exemplo, para reproduzir a atividade correspondente ao ponto central da relação bromelina pura / caseína de 1 / 25:

40 gramas de extrato	→	Atividade = 0,4671 (mmol tirosina / L.minuto)
Qual a massa de extrato para reproduzi-la?	←	Atividade = 0,3369 (mmol tirosina / L.minuto)

Para o exemplo citado, a massa de extrato deve ser de 28,8504 gramas.

Nota: estimativa da quantidade de enzima presente no fruto

Para a relação 1 bromelina pura / 25 caseína a concentração de enzima foi de 0,5333 g / L, portanto, no meio reacional, cujo volume é de 75 mL, a quantidade de bromelina pura é de 0,0400 gramas. Para reproduzir a atividade a quantidade de extrato foi calculada em 28,8504 gramas. Portanto, considerando que as 28,8504 gramas de extrato contém 0,0400 gramas de enzima, 1 kg do fruto deve conter 1,3865 gramas. Esta quantidade estimada de enzima no fruto vem ao encontro das 1 a 2 gramas de bromelina por quilograma de fruto, estimadas por TISSEAU (1986).

Foi estudado também o comportamento da atividade do extrato ao longo do tempo. Para tanto, três situações de estocagem foram consideradas:

- Geladeira: temperatura em + 7 °C.
- Congelador da geladeira: temperatura em – 15 °C.
- Freezer: temperatura em – 23 °C.

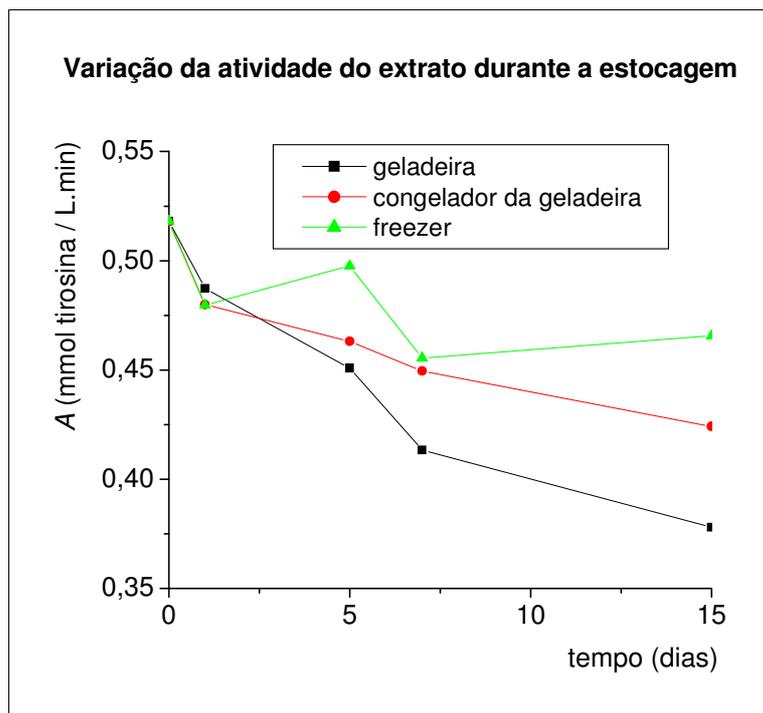


Figura 4.18 – Comportamento da atividade do extrato com a estocagem.

A Figura 4.18 mostra o comportamento da atividade enzimática do extrato para as três situações citadas, ao longo do tempo. Observa-se que a condição mais favorável para a preservação da enzima é a estocagem no *freezer*, onde após o período de 15 dias a atividade é de praticamente 90 % do valor original. Nas outras condições, após o mesmo período de tempo, a atividade fica em praticamente 82 % do valor original com estocagem no congelador da geladeira, e em praticamente 73 % com estocagem na geladeira. Portanto, visando melhor conservação, o extrato foi estocado no *freezer*.

4.3.2.1 Planejamento experimental para o extrato – base: relação 1 / 25.

Os ensaios foram efetuados em duplicata. Os resultados encontrados para atividade em função das variáveis codificadas estão na Tabela 4.12, apresentada no Apêndice VIII.

$$\begin{aligned}
 \text{Atividade}_{\substack{\text{Extrato} \\ \text{base 1 / 25}}} = & 0,3754 - 0,0658 pH_{cd} + 0,1006 t_{cd} - 0,0383 pH_{cd}^2 \\
 & - 0,0158 t_{cd}^2 - 0,0154 pH_{cd} t_{cd}
 \end{aligned}
 \quad (4.20)$$

Os resultados foram tratados empregando o aplicativo computacional

MINITAB 15 da Minitab Inc. A equação (4.20) mostra o modelo quadrático resultante, em função das variáveis codificadas.

A superfície de resposta descrita pelo modelo é apresentada na Figura 4.19. A projeção da superfície de resposta sobre o plano formado pelos eixos temperatura codificada e pH codificado é apresentada na Figura 4.20.

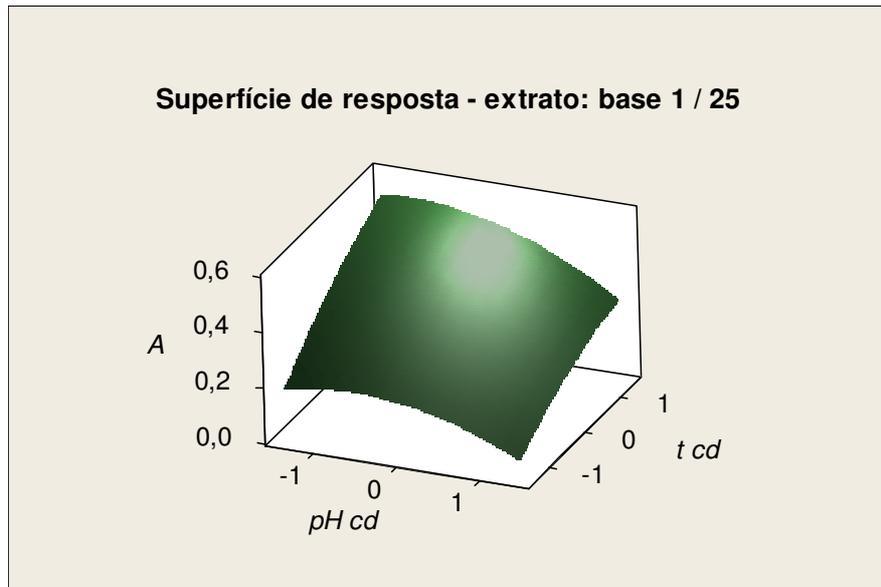


Figura 4.19 – Superfície de resposta para o extrato – base: relação 1/25.

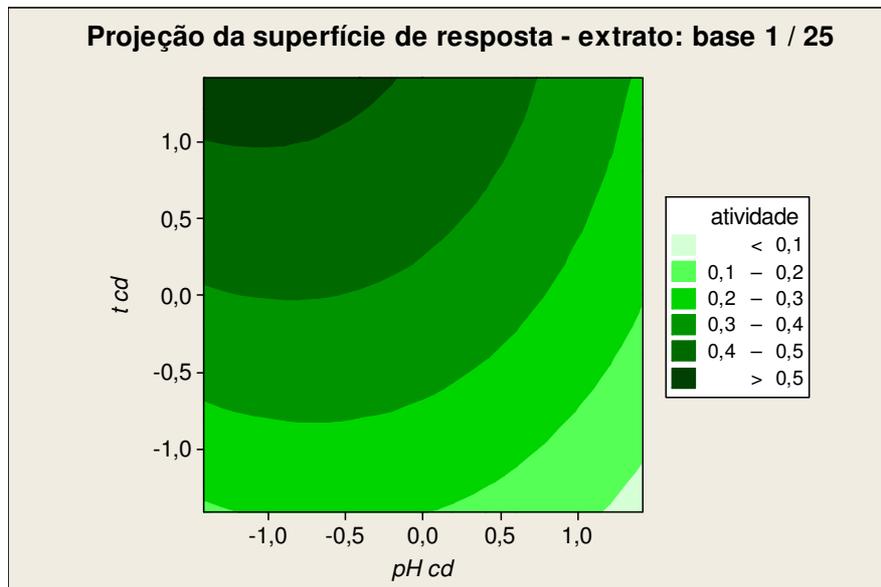


Figura 4.20 – Projeção da superfície de resposta o extrato – base: relação 1/25.

A análise de variância levou aos resultados apresentados na Tabela 4.13. Com base nestes resultados calculou-se o coeficiente de determinação do

modelo, dado pela equação (3.19) e a variação explicável máxima, dada pela equação (3.20).

Tabela 4.13 – Análise de variância – extrato: base relação 1 / 25.

Fonte de variação	Soma quadrática (SQ)	Valor encontrado
Regressão	$SQ_R = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	0,2498
Resíduos	$SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	0,0089
Erro puro	$SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	0,0061
Total	$SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	0,2587

Coeficiente de determinação do modelo:

$$R^2 = \frac{SQ_R}{SQ_T} = \frac{0,2498}{0,2587} = 0,9656$$

Significa que 96,56 % da variação é explicada pelo modelo.

Variação explicável máxima:

$$\frac{SQ_T - SQ_{ep}}{SQ_T} = \frac{0,2587 - 0,0061}{0,2587} = 0,9764$$

A variação explicável máxima do modelo é de 97,64 %.

O ajuste aos resultados experimentais foi verificado construindo-se um gráfico dos valores de atividade previstos pelo modelo em função dos valores encontrados experimentalmente, conforme mostra a Figura 4.21.

O coeficiente de determinação do modelo, a variação explicável máxima e o gráfico da Figura 4.21 mostram que a equação (4.20) é satisfatória para expressar como a atividade enzimática varia em função da temperatura e do pH (dentro dos limites do planejamento tipo estrela, nos quais os ensaios foram efetuados).

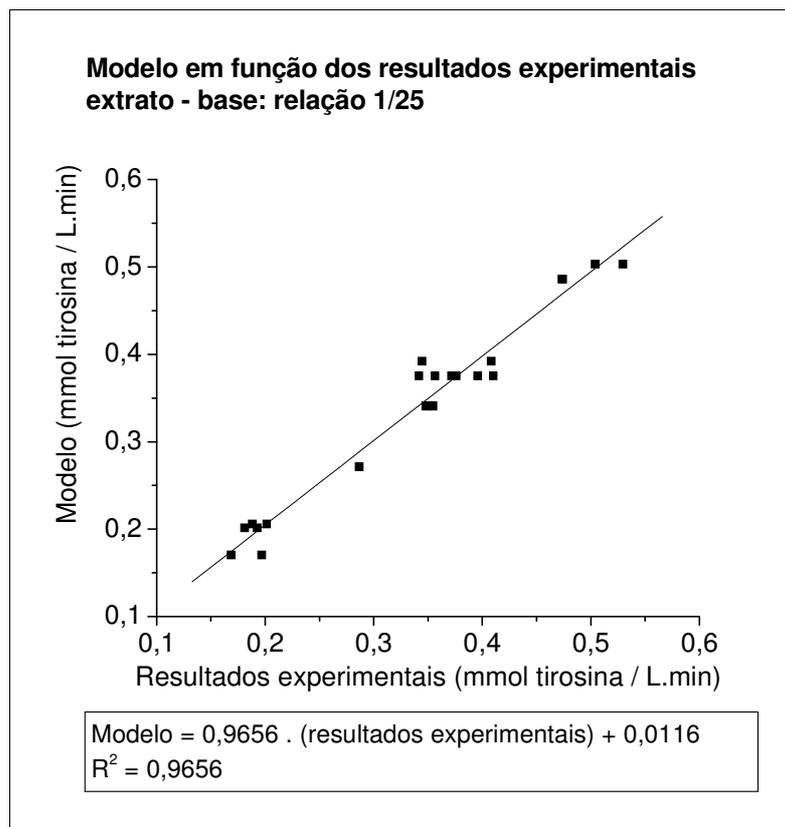


Figura 4.21 – Gráfico comparativo para o modelo – extrato base relação 1 / 25.

A exemplo do que foi feito nos itens referentes ao planejamento experimental para bromelina pura, a uma temperatura codificada constante um plano paralelo ao plano definido pelos eixos atividade e pH codificado (Figura 4 .19) corta a superfície de resposta, definindo uma curva da atividade em função do pH codificado. Derivando a equação do modelo (equação 4.20) com relação ao pH codificado, para dada temperatura codificada constante tem-se:

$$\left(\frac{d(\text{atividade})}{d \text{ pH}} \right)_{t_{cd} \text{ constante}} = -0,0658 - 0,0765 \text{ pH}_{cd} - 0,0154 t_{cd} \quad (4.21)$$

A equação (4.21) é a derivada da curva definida pela intersecção do plano acima referido. Igualando a equação derivada a zero, tem-se o ponto de máximo da função:

$$-0,0658 - 0,0765 \text{ pH}_{cd} - 0,0154 t_{cd} = 0$$

$$\text{pH}_{cd \text{ ótimo}}^{\text{extrato-base: 1/25}} = -0,8592 - 0,2008 t_{cd} \quad (4.22)$$

A equação (4.22) define o pH ótimo, para dada temperatura, no qual deve-se trabalhar para obter a maior atividade enzimática no caso do extrato base: relação 1 / 25. Para os ensaios relativos a estabilidade térmica e cinética enzimática, utilizou-se a equação (4.22) para definir o pH.

Substituindo a equação (4.22) na equação do modelo (equação 4.20), tem-se a equação (4.23), que relaciona a atividade enzimática para pH codificado ótimo em função da temperatura codificada.

$$Atividade_{\substack{\text{pH}_{cd} \text{ ótimo} \\ \text{extrato-base: 1 / 25}}} = 0,4037 + 0,1138 t_{cd} - 0,0143 t_{cd}^2 \quad (4.23)$$

A Figura 4.22 mostra o gráfico da atividade para pH ótimo em função da temperatura codificada (equação 4.23).

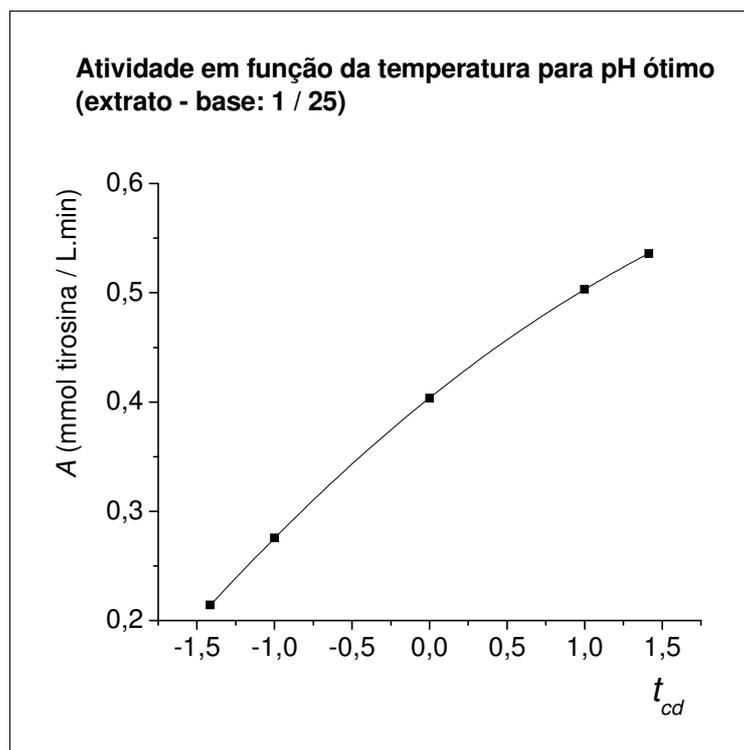


Figura 4.22 – Gráfico da atividade para pH ótimo em função da temperatura codificada. Extrato – base: relação 1 / 25.

4.3.2.2 Planejamento experimental para o extrato – base: relação 1 / 50.

Os ensaios também foram efetuados em duplicata. Os resultados encontrados para atividade em função das variáveis codificadas estão na

Tabela 4.14, apresentada no Apêndice IX. Os resultados foram tratados empregando o aplicativo computacional MINITAB 15 da Minitab Inc. A equação (4.24) mostra o modelo quadrático resultante, em função das variáveis codificadas.

$$\begin{aligned} \text{Atividade}_{\text{Extrato}}^{\text{base 1/50}} = & 0,2963 - 0,0570 \text{pH}_{cd} + 0,0796 t_{cd} - 0,0500 \text{pH}_{cd}^2 \\ & - 0,0065 t_{cd}^2 - 0,0358 \text{pH}_{cd} t_{cd} \end{aligned} \quad (4.24)$$

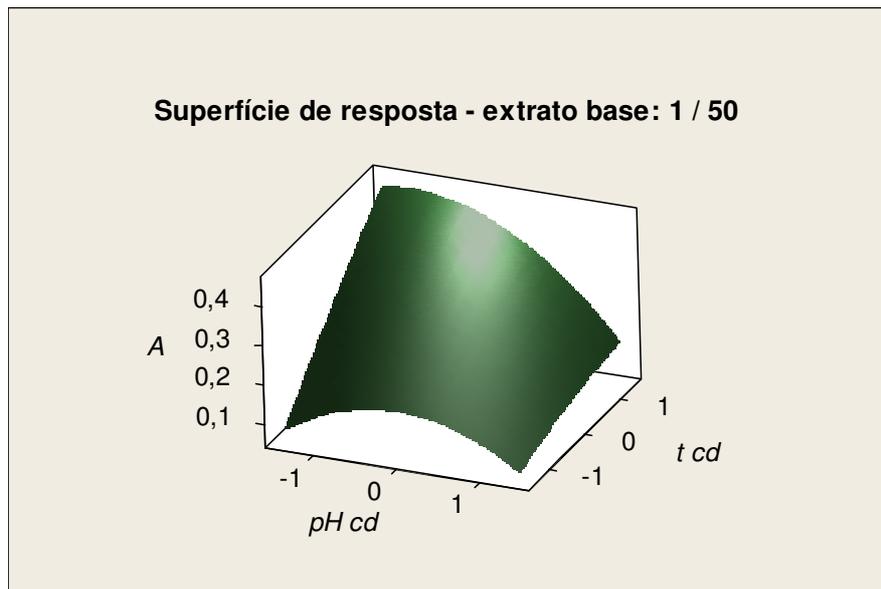


Figura 4.23 – Superfície de resposta para o extrato – base: relação 1/50.

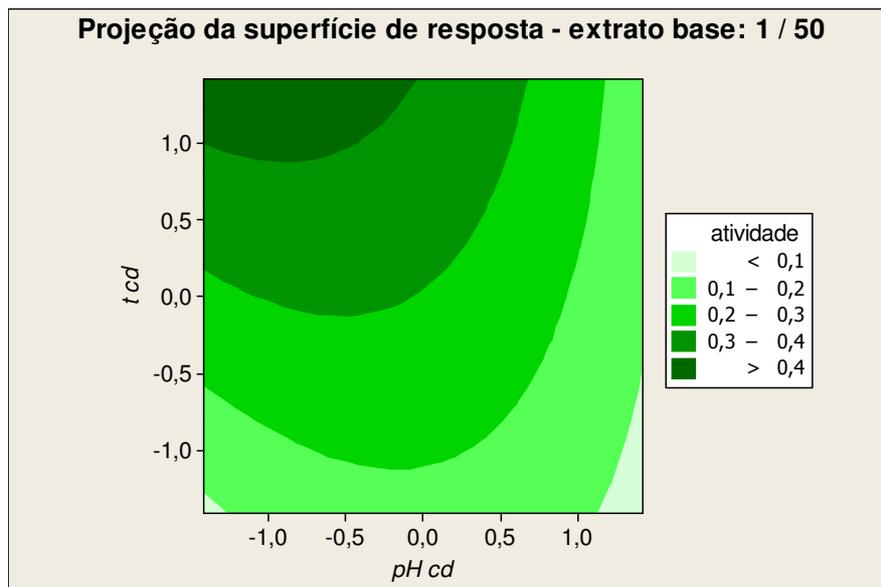


Figura 4.24 – Projeção da superfície de resposta o extrato – base: relação 1/50.

A superfície de resposta descrita pelo modelo é apresentada na Figura 4.23. e a sua projeção na Figura 4.24. A análise de variância levou aos resultados apresentados na Tabela 4.15; com base neles calculou-se o coeficiente de determinação do modelo dado pela equação (3.19), e a variação explicável máxima, dada pela equação (3.20).

Tabela 4.15 – Análise de variância – extrato: base relação 1 / 50

Fonte de variação	Soma quadrática (SQ)	Valor encontrado
Regressão	$SQ_R = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	0,1929
Resíduos	$SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	0,0041
Erro puro	$SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	0,00089
Total	$SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	0,1970

Coeficiente de determinação do modelo:

$$R^2 = \frac{SQ_R}{SQ_T} = \frac{0,1929}{0,1970} = 0,9792$$

Significa que 97,92 % da variação é explicada pelo modelo.

Variação explicável máxima:

$$\frac{SQ_T - SQ_{ep}}{SQ_T} = \frac{0,1970 - 0,00089}{0,1970} = 0,9955$$

A variação explicável máxima do modelo é de 99,55 %.

A Figura 4.25 mostra o gráfico dos valores de atividade previstos pelo modelo em função dos valores encontrados experimentalmente.

O coeficiente de determinação do modelo, a variação explicável máxima e o gráfico da Figura 4.25 mostram que a equação (4.24) é satisfatória para expressar como a atividade enzimática varia em função da temperatura e do pH (dentro dos limites do planejamento experimental).

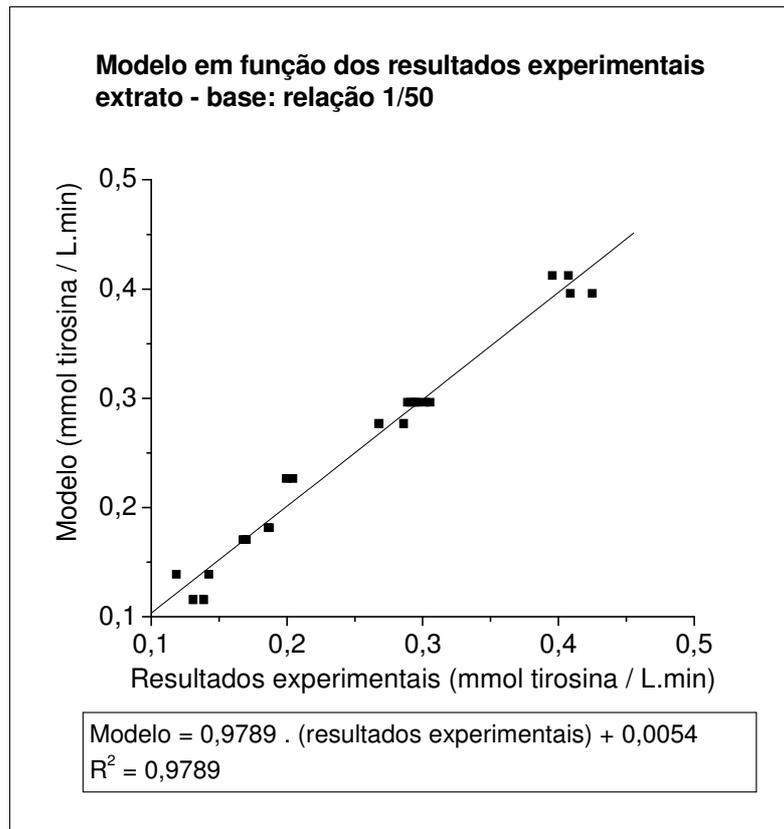


Figura 4.25 – Gráfico comparativo para o modelo – extrato base relação 1 / 50.

A exemplo do que foi feito nos itens anteriores, para uma temperatura codificada constante, um plano paralelo ao plano definido pelos eixos atividade e pH codificado (Figura 4 .23) corta a superfície de resposta, definindo uma curva da atividade em função do pH codificado. Derivando a equação do modelo (equação 4.24) com relação ao pH codificado, para dada temperatura codificada constante tem-se:

$$\left(\frac{d(\text{atividade})}{d \text{pH}} \right)_{t_{cd} \text{ constante}} = -0,0570 - 0,1001 \text{pH}_{cd} - 0,0358 t_{cd} \quad (4.25)$$

A equação (4.25) é a derivada da curva definida pela intersecção do plano acima referido. Igualando a equação derivada a zero, tem-se o ponto de máximo da função:

$$-0,0570 - 0,1001 \text{pH}_{cd} - 0,0358 t_{cd} = 0$$

$$\text{pH}_{cd \text{ ótimo}}^{\text{extrato-base: 1/50}} = -0,5699 - 0,3578 t_{cd} \quad (4.26)$$

A equação (4.26) define o pH ótimo, para dada temperatura, no qual deve-se trabalhar para obter a maior atividade enzimática no caso do extrato base: relação 1 / 50. Para os ensaios relativos a cinética enzimática utilizou-se a equação (4.26) para definir o pH.

Substituindo a equação (4.26) na equação do modelo (equação 4.24), tem-se a equação (4.27), que relaciona a atividade enzimática para pH codificado ótimo em função da temperatura codificada.

$$\text{Atividade}_{\substack{\text{pH}_{cd} \text{ ótimo} \\ \text{extrato-base: 1 / 50}}} = 0,3126 + 0,1000 t_{cd} - 9,5 \times 10^{-5} t_{cd}^2 \quad (4.27)$$

A Figura 4.26 mostra o gráfico da atividade para pH ótimo em função da temperatura codificada (equação 4.27).

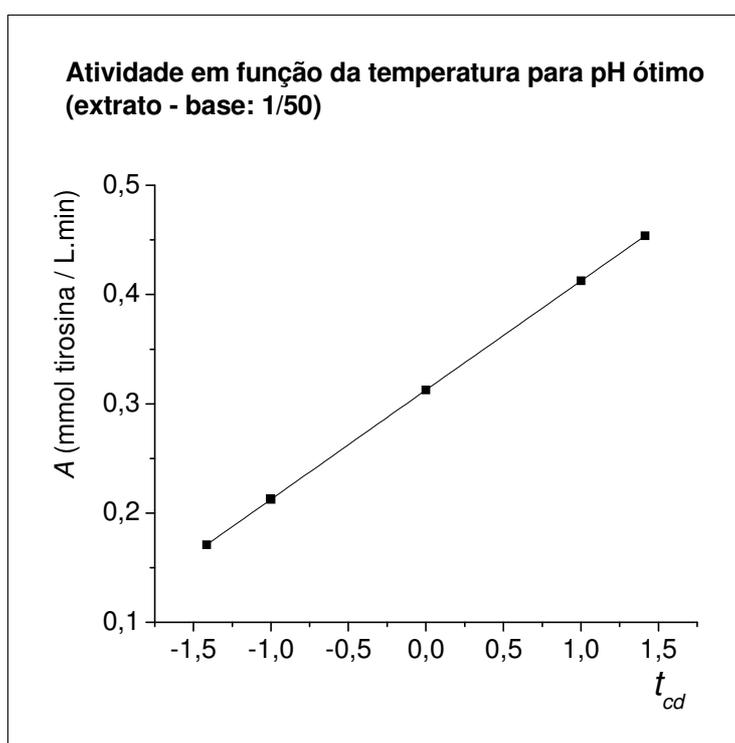


Figura 4.26 – Gráfico da atividade para pH ótimo em função da temperatura codificada. Extrato – base: relação 1 / 50.

4.3.2.3 Planejamento experimental para o extrato – base: relação 1 / 125.

Os ensaios também foram efetuados em duplicata, e os resultados encontrados para atividade em função das variáveis codificadas estão na

Tabela 4.16, apresentada no Apêndice X. Eles foram tratados empregando o aplicativo computacional MINITAB 15 da Minitab Inc. A equação (4.28) mostra o modelo quadrático resultante, em função das variáveis codificadas.

$$\begin{aligned} \text{Atividade}_{\text{Extrato}}^{\text{base } 1/125} = & 0,0808 - 0,0045 \text{ pH}_{cd} + 0,0424 t_{cd} - 0,0157 \text{ pH}_{cd}^2 \\ & + 0,0065 t_{cd}^2 - 0,0089 \text{ pH}_{cd} t_{cd} \end{aligned} \quad (4.28)$$

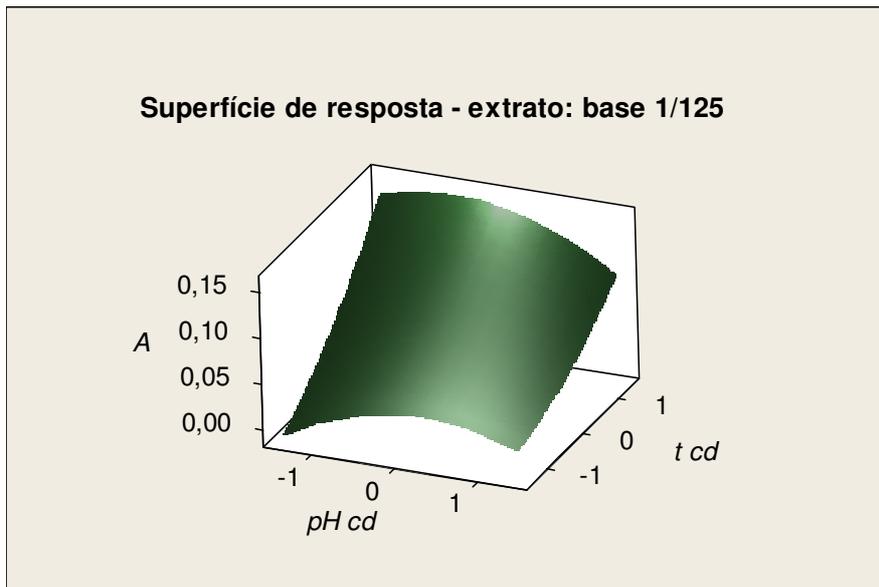


Figura 4.27 – Superfície de resposta para o extrato – base: relação 1/125.

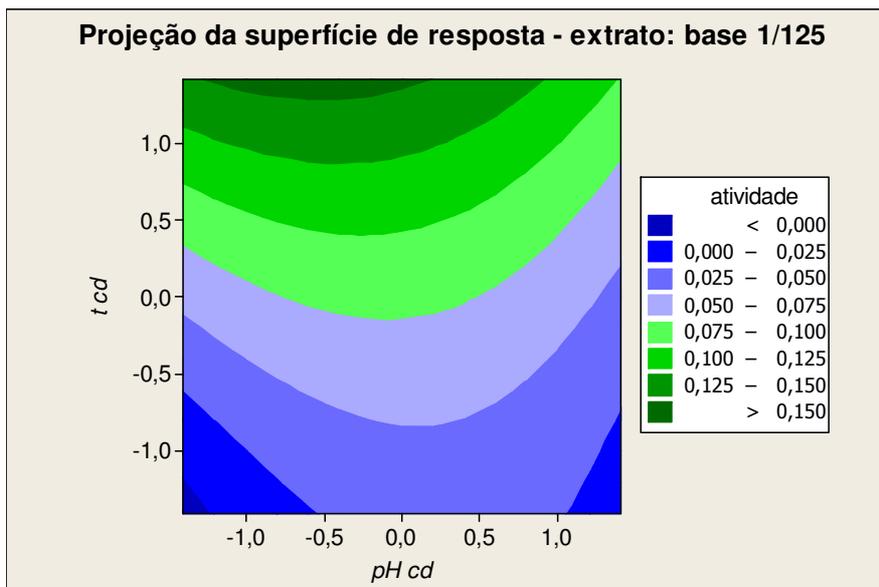


Figura 4.28 – Projeção da superfície de resposta para o extrato – base: relação 1/125.

A superfície de resposta descrita pelo modelo e a sua projeção encontram-se na Figura 4.27 e a na Figura 4.28, respectivamente. A análise de variância levou aos resultados apresentados na Tabela 4.17, e com base neles calculou-se o coeficiente de determinação do modelo, e a variação explicável máxima.

Tabela 4.17 – Análise de variância – extrato: base relação 1 / 125.

Fonte de variação	Soma quadrática (SQ)	Valor encontrado
Regressão	$SQ_R = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	0,0340
Resíduos	$SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	0,0016
Erro puro	$SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	0,0012
Total	$SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	0,0356

Coeficiente de determinação do modelo:

$$R^2 = \frac{SQ_R}{SQ_T} = \frac{0,0340}{0,0356} = 0,9551$$

Significa que 95,51 % da variação é explicada pelo modelo.

Variação explicável máxima:

$$\frac{SQ_T - SQ_{ep}}{SQ_T} = \frac{0,0356 - 0,0012}{0,0356} = 0,9663$$

A variação explicável máxima do modelo é de 96,63 %.

A Figura 4.29 mostra o gráfico dos valores de atividade previstos pelo modelo em função dos valores encontrados experimentalmente.

O coeficiente de determinação do modelo, a variação explicável máxima e o gráfico da Figura 4.29 mostram que a equação (4.28) é satisfatória para expressar como a atividade enzimática varia em função da temperatura e do pH (dentro dos limites do planejamento experimental).

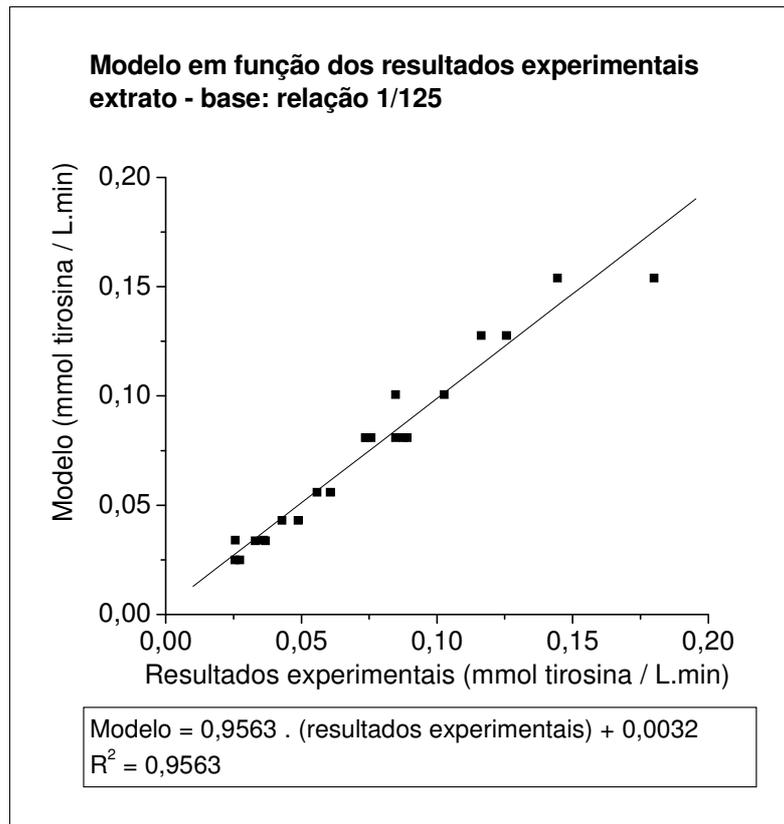


Figura 4.29 – Gráfico comparativo para o modelo – extrato base relação 1 / 125.

A exemplo dos itens anteriores, derivando a equação do modelo (equação 4.28) com relação ao pH codificado, para dada temperatura codificada constante tem-se:

$$\left(\frac{d(\text{atividade})}{d \text{pH}} \right)_{t_{cd} \text{ constante}} = -0,0045 - 0,0314 \text{pH}_{cd} - 0,0089 t_{cd} \quad (4.29)$$

Igualando a equação derivada a zero, tem-se o ponto de máximo da função:

$$-0,0045 - 0,0314 \text{pH}_{cd} - 0,0089 t_{cd} = 0$$

$$\text{pH}_{cd \text{ ótimo}}^{\text{extrato-base: 1/125}} = -0,1446 - 0,2853 t_{cd} \quad (4.30)$$

A equação (4.30) define o pH ótimo, a dada temperatura, para obter a maior atividade enzimática referente à relação extrato base 1 / 125. Para os ensaios relativos a cinética enzimática o pH foi definido pela equação (4.30).

Substituindo a equação (4.30) na equação do modelo (equação 4.28),

tem-se a equação (4.31), que relaciona a atividade enzimática para pH codificado ótimo em função da temperatura codificada.

$$Atividade_{\substack{\text{pH}_{cd} \text{ ótimo} \\ \text{extrato-base: 1/125}}} = 0,0811 + 0,0437 t_{cd} + 0,0078 t_{cd}^2 \quad (4.31)$$

A Figura 4.30 mostra o gráfico da atividade para pH ótimo em função da temperatura codificada (equação 4.31).

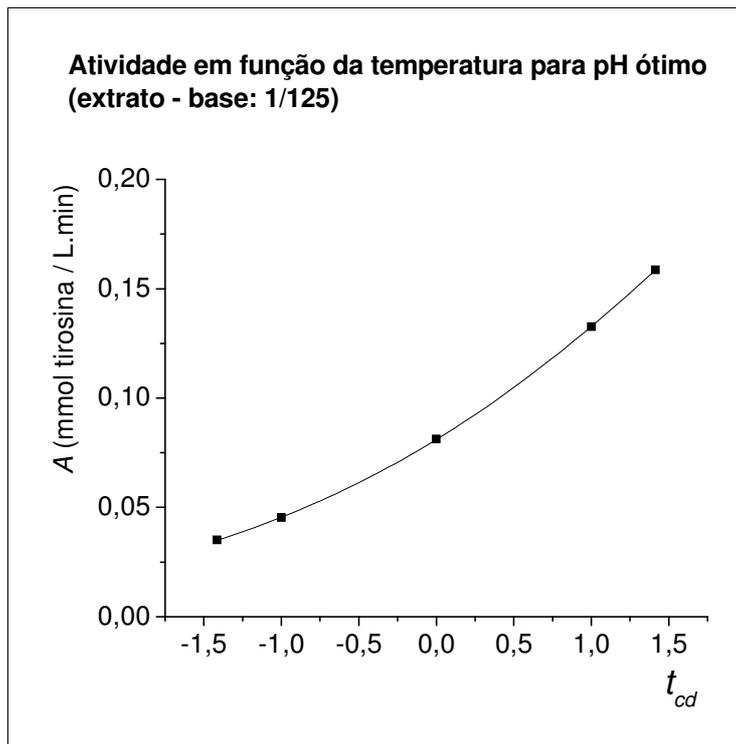


Figura 4.30 – Gráfico da atividade para pH ótimo em função da temperatura codificada. Extrato – base: relação 1 / 125.

4.3.2.4 Comparativo entre as relações enzima / substrato para o extrato

A Figura 4.31 mostra o gráfico da atividade para pH ótimo em função da temperatura para as três relações enzima / caseína, relativas ao extrato do fruto.

Para as três relações, tomando como referência o ponto central da temperatura, ou seja, o ponto onde a temperatura codificada é igual a zero, segue que:

$$Atividade_{\substack{\text{pH}_{cd} \text{ ótimo} \\ \text{extrato-base: 1/25}}} = 0,4037 + 0,1138 t_{cd} - 0,0143 t_{cd}^2 \quad (4.23)$$

Para $t_{cd} = 0$:

$$Atividade_{\text{extrato-base: 1 / 25}}^{\text{pH}_{cd} \text{ ótimo}} = 0,4037 \quad (4.32)$$

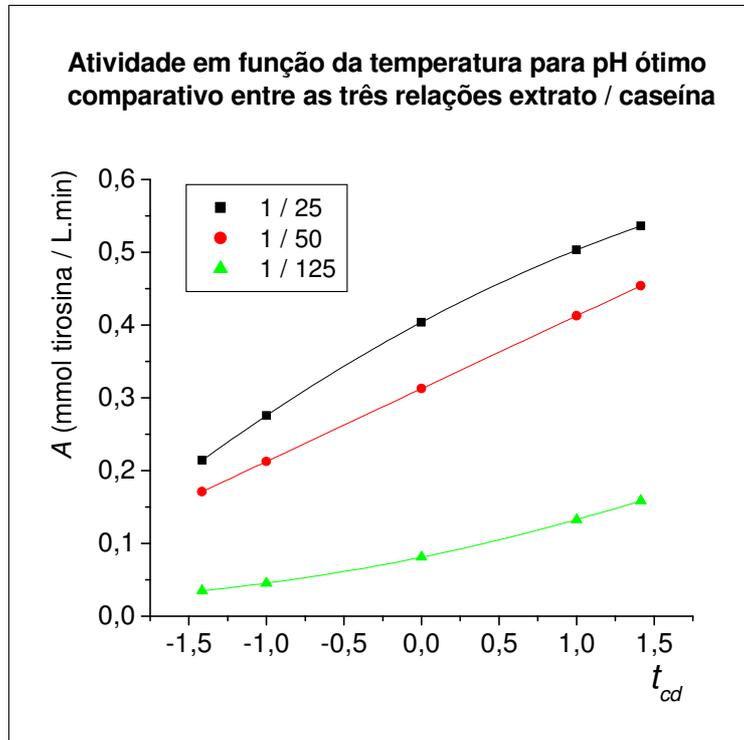


Figura 4.31 – Comparativo entre as três relações enzima / caseína, relativas ao extrato.

Para as outras duas relações:

$$Atividade_{\text{extrato-base: 1 / 50}}^{\text{pH}_{cd} \text{ ótimo}} = 0,3126 \quad (4.33)$$

$$Atividade_{\text{extrato-base: 1 / 125}}^{\text{pH}_{cd} \text{ ótimo}} = 0,0811 \quad (4.34)$$

Dividindo a equação (4.32) pela equação (4.33):

$$\frac{Atividade_{\text{extrato base 1 / 25}}^{\text{pH}_{cd} \text{ ótimo}}}{Atividade_{\text{extrato base 1 / 50}}^{\text{pH}_{cd} \text{ ótimo}}} = \frac{0,4037}{0,3126} = 1,2914 \quad (4.35)$$

Dividindo a equação (4.32) pela equação (4.34):

$$\frac{Atividade_{\text{extrato base 1 / 25}}^{\text{pH}_{cd} \text{ ótimo}}}{Atividade_{\text{extrato base 1 / 125}}^{\text{pH}_{cd} \text{ ótimo}}} = \frac{0,4037}{0,0811} = 4,9778 \quad (4.36)$$

A equação (4.36) mostra que, tomando como referência o ponto central da temperatura, a atividade para a relação enzima (no extrato) / caseína, base: 1 / 125, ficou praticamente cinco vezes menor do que a relação 1 / 25, de acordo com o esperado. Entretanto, para a relação 1 / 50, que deveria apresentar metade da atividade da relação 1 / 25, o valor encontrado foi praticamente 1,3 vez menor. Este afastamento com relação ao valor esperado foi devido a alguma diferença na determinação da quantidade de extrato a ser empregada (definida em um ensaio preliminar de atividade). Decidiu-se considerar estes resultados uma vez que o objetivo principal não foi obter metade da atividade, mas sim efetuar o planejamento em três diferentes relações.

As discussões quanto ao comportamento da atividade nos planejamentos efetuados com o extrato são similares às aquelas efetuadas para a bromelina pura. A Figura 4.31 mostra que a atividade aumenta com o aumento da temperatura, porém para a relação base 1 / 25 nota-se que a tendência não é tão acentuada (na equação (4.23), o termo t_{cd}^2 apresenta sinal negativo, indicando um ponto de máximo); a superfície de resposta para o extrato relação base 1 / 25. (Figura 4.19) mostra esta tendência. Para a relação 1 / 50 a atividade aumenta com a temperatura de forma quase que linear, devido ao coeficiente do termo t_{cd}^2 ser pequeno ($-9,5 \times 10^{-5}$). Para a relação 1 / 125 o termo t_{cd}^2 é positivo, indicando comportamento diferente, como pode-se observar na Figura 4.27 (superfície de resposta para o extrato base: relação 1/125).

Como já discutido no item 4.3.1.4 (comparativo para a bromelina pura), pode-se fazer alguma previsão para valores maiores de temperatura. A tendência apresentada pela relação base 1 / 25 (com sinal negativo para o termo t_{cd}^2) pode ser explicada pela desativação térmica da enzima (por um lado, atividade aumenta com a temperatura, enquanto que por outro lado diminui pela desativação térmica). Para as relações base 1 / 50 e 1 / 125 o fenômeno deve acontecer em temperaturas maiores ($t_{cd} > +\sqrt{2}$, ou seja: $t > 49^\circ\text{C}$).

Para o extrato, a discussão sobre o comportamento com a temperatura também encontra apoio quando se considera o modelo de ação enzimática

pseudo-estacionário (SEGEL, 1993), a exemplo do que já foi feito para a bromelina pura (Figura 4.16) no item 4.3.1.4.

4.3.3 Comparativo entre os planejamentos experimentais para a bromelina pura e para o extrato do fruto

A Figura 4.32 mostra o gráfico da atividade para pH ótimo em função da temperatura codificada, considerando os planejamentos efetuados para a bromelina pura e para o extrato.

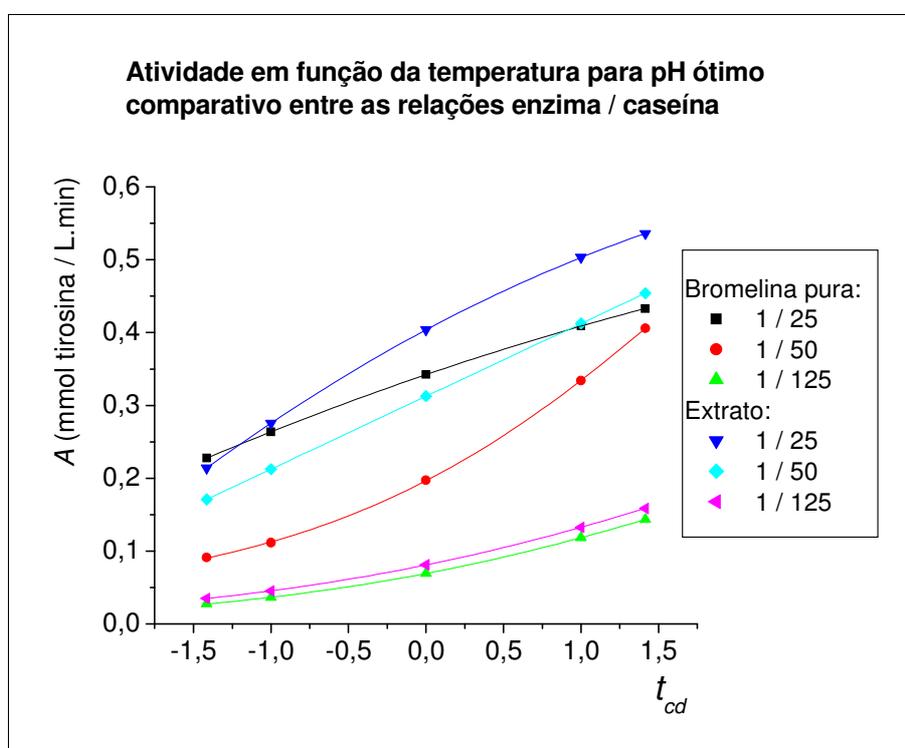


Figura 4.32 – Comparativo entre os planejamentos efetuados para bromelina pura e para o extrato.

Qualitativamente, a Figura 4.32 mostra que a enzima presente no extrato comporta-se de maneira semelhante à bromelina pura. Nas curvas para a relação 1 / 25 observa-se a tendência da atividade atingir um ponto de máximo. Na curva para o extrato, base 1 / 50, observa-se que o comportamento é intermediário entre a bromelina pura relação 1 / 50 e bromelina pura relação 1 / 25, e também intermediário com relação ao extrato base 1 / 25. O comportamento para o extrato base 1 / 50 explica-se pela proximidade da atividade no ponto central com a atividade da relação bromelina pura 1 / 25; em outras palavras, o planejamento

para a relação extrato base 1 / 50 foi efetuado com uma quantidade de extrato mais próxima da relação bromelina pura 1 / 25 do que da relação bromelina pura 1 / 50. As curvas para bromelina pura relação 1 / 125 e extrato base 1 / 125 foram praticamente coincidentes.

Para os ensaios com o extrato procurou-se reproduzir a mesma atividade encontrada nos ensaios com bromelina pura, tomando como referência o ponto central do planejamento. Entretanto, observa-se que, com exceção à relação 1 / 125, esta meta não foi alcançada. Este afastamento com relação ao valor esperado explica-se como sendo devido a alguma diferença na determinação da quantidade de extrato a ser empregada. Como já comentado (item 4.3.2.4), o objetivo principal não foi reproduzir a atividade, mas sim efetuar o planejamento em diferentes relações.

4.4 Estabilidade térmica da enzima

A estabilidade térmica foi estudada fazendo medidas da atividade enzimática ao longo do tempo. O cálculo da atividade seguiu a mesma rotina já exemplificada no item 4.3.

De acordo com a literatura, apresentada no item 2.7, a decomposição térmica da bromelina segue uma cinética de ordem um. Os ensaios e o tratamento dos resultados para a bromelina pura e para o extrato seguiram o método citado no item 3.14. O estudo considerou a relação 1 / 25 para a bromelina e a relação base 1 / 25 para o extrato.

Conforme SRIWATANAPONGSE, BALABAN & TEIXEIRA (2000) a desativação térmica da bromelina ocorre de forma acentuada ao longo do tempo, quando mantida com o pH em 3,4. Para fins de comparação, os ensaios foram efetuados com o pH previsto no planejamento e com o pH entre 3,3 e 3,5. A preparação para os ensaios com o pH previsto no planejamento seguiu a rotina já citada no capítulo Materiais e Métodos, porém, para o pH entre 3,3 e 3,5, a rotina teve que ser adaptada, pois a caseína precipita nestes valores de pH. A adaptação efetuada foi a seguinte:

- Como tanto a bromelina pura como o extrato apresentam pH natural entre 3,6 e 3,8, seu valor foi ajustado entre 3,3 e 3,5 pela adição de pequena quantidade de HCl 1 M (proporção de 1 mL para cada 65 mL da dispersão), sem necessidade de adicionar tampão. Verificou-se que o pH ficou no valor desejado durante os ensaios.
- A dispersão de caseína foi preparada com 50 % a mais de tampão com relação à sua preparação normal, descrita no item 3.3. Esta quantidade adicional de tampão foi feita prevendo o futuro contato com a dispersão de enzima sem tampão. Durante os ensaios, o pH do meio reacional ficou no valor previsto, de acordo com o planejamento.
- Imediatamente antes do ensaio, foram pipetados 30 mL da dispersão de extrato (ou 15 mL no caso da dispersão de bromelina) no reator. Em seguida, foram adicionados 20 mL de solução de NaOH sobre o extrato (ou 10 mL no caso da dispersão de bromelina), ajustando o pH no mesmo valor do pH da caseína. A concentração de NaOH para correção do pH foi definida por ensaios prévios.
- Sobre a dispersão de extrato no reator, adicionou-se 25 mL da dispersão de caseína a 40 g / L (ou 50 mL da dispersão de caseína 20 g / L sobre a dispersão de bromelina).

Com a adaptação de procedimento descrita, foi possível deixar as dispersões de bromelina e extrato no pH baixo (3,3 a 3,5), e na temperatura de trabalho ao longo do tempo, e fazer os ensaios de atividade com a hidrólise da caseína acontecendo no pH previsto pelo planejamento.

Os valores de pH empregados conforme o planejamento foram calculados pelas equações $pH_{cd \text{ ótimo}}$ em função de t_{cd} (item 4.3), obtendo-se assim a maior atividade para dada condição. Por exemplo, para $t_{cd} = +1$, e ensaio da bromelina pura relação 1 / 25:

$$pH_{cd \text{ ótimo}}^{\text{bromelina pura 1 / 25}} = -0,3547 - 0,2425 t_{cd}$$

$$pH_{cd \text{ ótimo}}^{\text{bromelina pura 1 / 25}} = -0,3547 - 0,2425 \times 1 = -0,5972$$

Como:

$$pH_{cd} = \frac{pH - 7,0}{1} \quad (3.15)$$

$$-0,5972 = \frac{pH - 7,0}{1}$$

$$pH = 6,4028 \cong 6,4$$

Para todos os valores de pH de trabalho calculados, os limites máximo e mínimo foram estabelecidos em $+0,1$ e $-0,1$; fáceis de atender, uma vez que o meio está tamponado, e resultam em pequena variação na atividade, conforme observa-se no seguinte exemplo, considerando $t_{cd} = 0$

Para $pH = 6,3$:

$$pH_{cd} = \frac{6,3 - 7,0}{1} = -0,7$$

Para, a equação do modelo (equação 4.3):

$$\begin{aligned} \text{Atividade}_{\text{Bromelina pura}}^{1/25} = & 0,3369 - 0,0299 pH_{cd} + 0,0653 t_{cd} - 0,0422 pH_{cd}^2 \\ & - 0,00845 t_{cd}^2 - 0,0205 pH_{cd} t_{cd} \end{aligned} \quad (4.3)$$

A atividade prevista é:

$$\text{Atividade}_{\text{Bromelina pura}}^{1/25} = 0,3371$$

Para $pH = 6,5$:

$$pH_{cd} = \frac{6,5 - 7,0}{1} = -0,5$$

A atividade prevista é:

$$\text{Atividade}_{\text{Bromelina pura}}^{1/25} = 0,3413$$

Como já comentado no item 4.3.2, para o extrato, cuja quantidade necessária para cada ensaio ficou acima de 20 g, o volume adicionado foi de 50 mL, e a dispersão de caseína, preparada na concentração de 40 g / L, foi de

25 mL. Assim a concentração de caseína no meio reacional permaneceu no valor de 13,3333 g / L. Também, a quantidade de substâncias detectáveis a 280 nm presentes no extrato excedeu o limite de leitura, portanto, foi necessário fazer uma diluição adicional das alíquotas retiradas tanto do branco quanto do ensaio com caseína avolumando-as de 5 mL para 25 mL.

4.4.1 Estabilidade térmica da bromelina pura relação 1 / 25: pH conforme o planejamento

Foram efetuados dois conjuntos de ensaios obtendo-se, para cada um, dez pontos ao longo de 180 minutos. As Tabelas 4.18 e 4.19 mostram os resultados obtidos.

Tabela 4.18 – Estabilidade térmica: bromelina pura 1 / 25. pH conforme planejamento: primeiro conjunto de ensaios.

Tempo (minutos)	Atividade $\left(\frac{\text{mmol tirosina}}{\text{L min}} \right)$				
	Temperatura (°C)				
	25	35	44	53	62
0	0,2598	0,3485	0,4347	0,4909	0,6144
20	0,2605	0,3353	0,4211	0,4342	0,4166
40	0,2559	0,3297	0,3956	0,3736	0,2867
60	0,2533	0,3204	0,3755	0,3335	0,2123
80	0,2499	0,3079	0,3642	0,2956	0,1808
100	0,2467	0,3093	0,3506	0,2595	0,1604
120	0,2438	0,3090	0,3262	0,2346	0,1565
140	0,2423	0,4413	0,2825	0,2233	0,1457
160	0,2483	0,2856	0,2761	0,2135	0,1446
180	0,2699	0,4575	0,2834	0,2216	0,1098

Tabela 4.19 – Estabilidade térmica: bromelina pura 1 / 25. pH conforme planejamento: segundo conjunto de ensaios.

Tempo (minutos)	Atividade $\left(\frac{\text{mmol tirosina}}{\text{L min}} \right)$				
	Temperatura (°C)				
	25	35	44	53	62
0	0,2354	0,3553	0,4791	0,5974	0,6442
20	0,2292	0,3578	0,4676	0,5473	0,4216
40	0,2237	0,3459	0,4405	0,5020	0,2674
60	0,2282	0,3382	0,4278	0,4507	0,1982
80	0,2248	0,3229	0,4094	0,4057	0,1668
100	0,2215	0,3140	0,3919	0,3639	0,1496
120	0,2189	0,3063	0,3759	0,3157	0,1360
140	0,2185	0,2934	0,3495	0,2840	0,1320
160	0,2171	0,2836	0,3230	0,2651	0,1287
180	0,2112	0,2611	0,3112	0,2154	0,1201

A equação vista para a cinética da decomposição térmica da enzima foi:

$$\ln \frac{A}{A_0} = -k_i \theta \quad (3.27)$$

Para verificar se o modelo corresponde aos resultados construíram-se os gráficos $-\ln \left(\frac{A}{A_0} \right)$ em função do tempo θ , mostrados nas Figuras 4.33 e 4.34.

Eles foram construídos eliminando os pontos que resultaram em $-\ln \left(\frac{A}{A_0} \right) < 0$ (dois pontos para temperatura de 25 °C e dois pontos para temperatura de 35 °C no primeiro conjunto e um ponto para temperatura de 35 °C no segundo conjunto de ensaios). Estes resultados foram eliminados uma vez que não é coerente que a atividade ao longo do tempo venha a ser maior do que a atividade inicial. É certo que tenha ocorrido algum erro de amostragem ou de leitura.

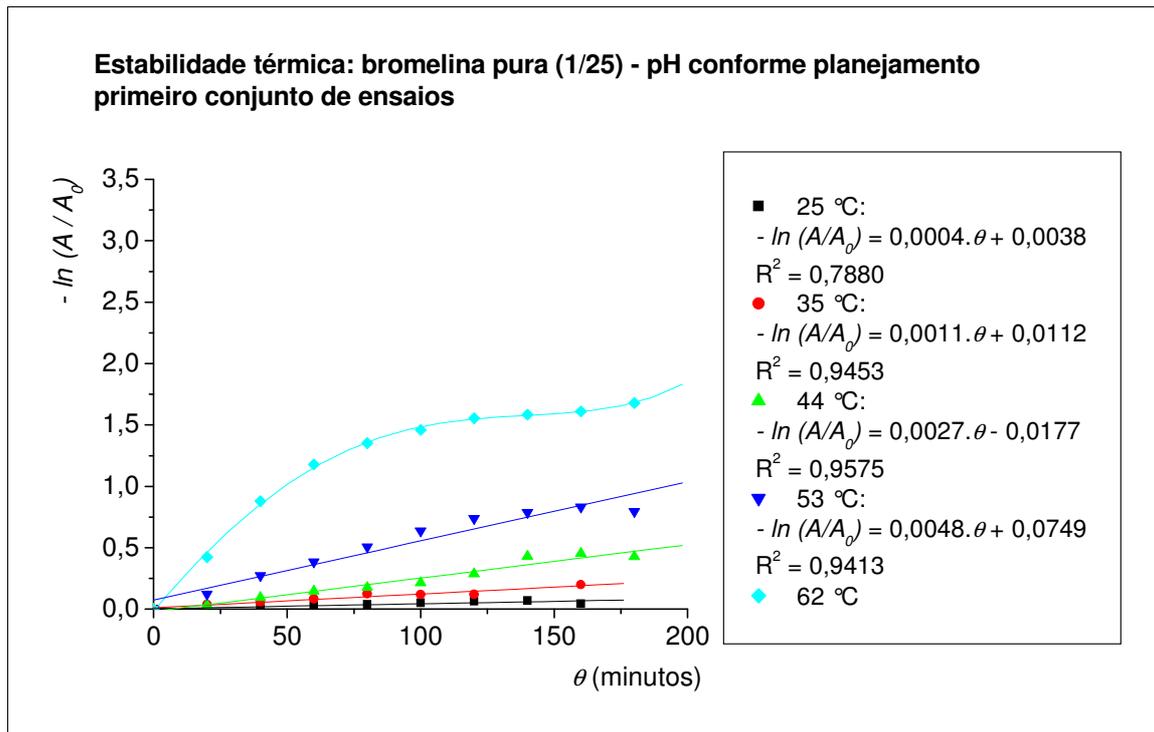


Figura 4.33 – Gráfico $-\ln\left(\frac{A}{A_0}\right)$ em função de θ para bromelina pura 1 / 25; pH conforme planejamento: primeiro conjunto de ensaios.

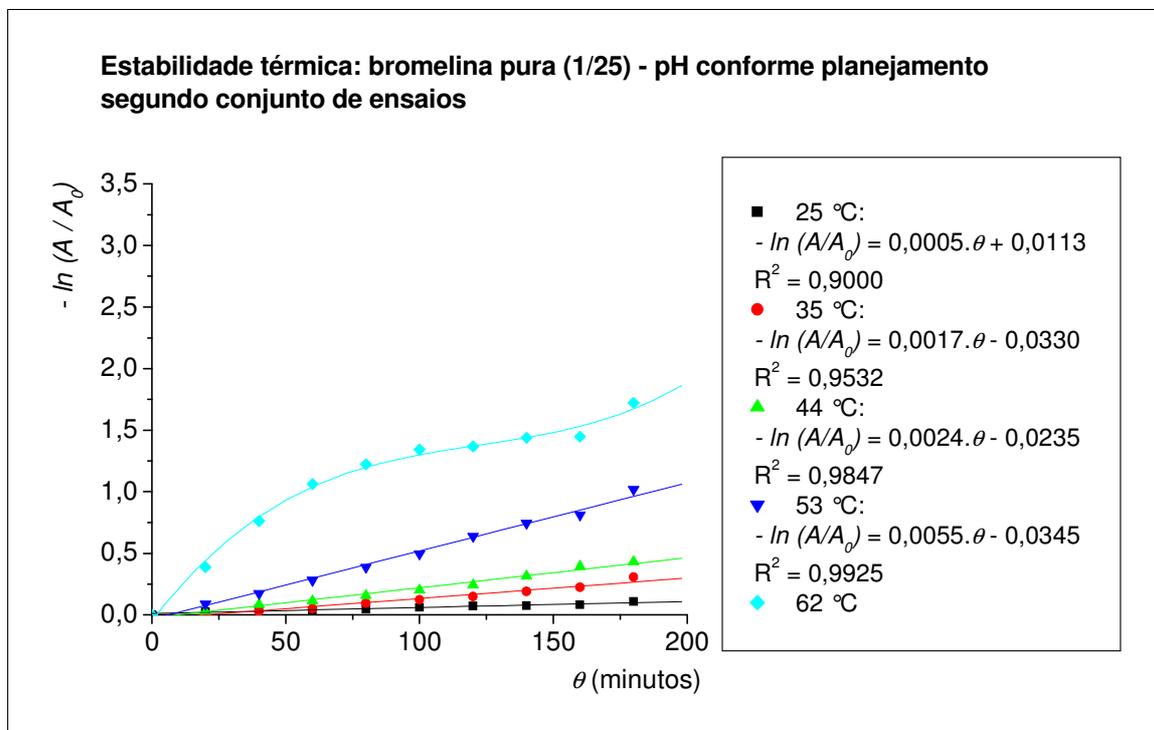


Figura 4.34 – Gráfico $-\ln\left(\frac{A}{A_0}\right)$ em função de θ para bromelina pura 1 / 25; pH conforme planejamento: segundo conjunto de ensaios.

Para as temperaturas de 25 °C, 35 °C, 44 °C e 53 °C, os gráficos mostram que o modelo de ordem um é adequado para representar a desativação da enzima, uma vez que os resultados experimentais concordaram com a dependência de $-\ln\left(\frac{A}{A_0}\right)$ em função de θ . Os valores da constante de inativação k_i podem ser obtidos pelas equações apresentadas junto aos gráficos, que estão na forma:

$$-\ln\left(\frac{A}{A_0}\right) = k_i \theta + b$$

Desenvolvendo:

$$\frac{A}{A_0} = e^{-(k_i \theta + b)} = e^{-k_i \theta} e^{-b}$$

Os valores de b são tais que pode-se considerar o termo $e^{-b} \cong 1$.

$$\text{Portanto: } -\ln\left(\frac{A}{A_0}\right) \cong k_i \theta$$

A Tabela 4.20 mostra os valores de k_i encontrados.

Tabela 4.20 – Valores da constante de inativação k_i para bromelina pura relação 1 / 25 e pH conforme o planejamento experimental.

Temperatura (°C)	Constante de inativação k_i (<i>minuto</i> ⁻¹)	
	1º conjunto de ensaios	2º conjunto de ensaios
25	0,0004	0,0005
35	0,0011	0,0017
44	0,0027	0,0024
53	0,0048	0,0055

A energia de ativação pode ser encontrada considerando a dependência de k_i com a temperatura conforme a equação de Arrhenius (equação 2.22).

$$\ln k_i = \ln k_0 - \frac{E_a}{RT} \quad (2.22)$$

A Figura 4.35 mostra o gráfico de $\ln k_i$ em função de $\frac{1}{T}$, do qual pode-se obter a energia de ativação. Observa-se no gráfico, pelos valores do coeficiente de correlação, que o modelo de Arrhenius é adequado para descrever a dependência da constante de inativação com a temperatura.

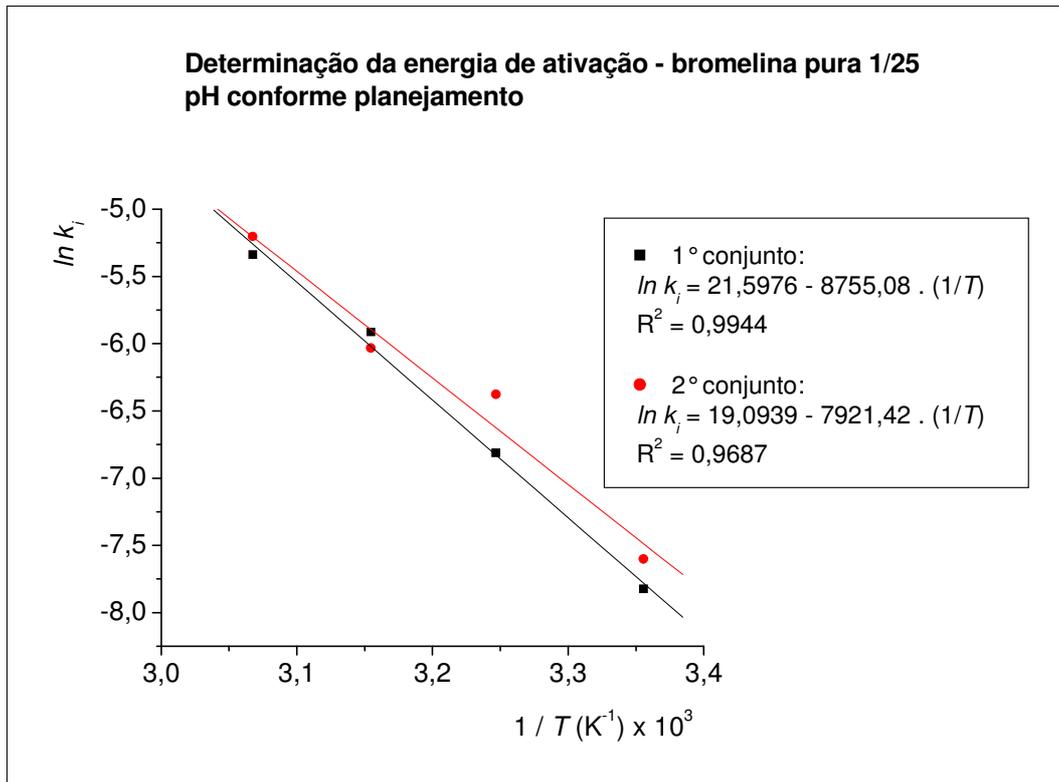


Figura 4.35 – Gráfico de $\ln k_i$ em função de $\frac{1}{T}$ para bromelina pura relação 1 / 25 e pH conforme planejamento.

Tabela 4.21 – Valores da energia de ativação e do fator de freqüência para bromelina pura, relação 1 / 25 e pH conforme planejamento.

	1º conjunto de ensaios	2º conjunto de ensaios
k_0 (minuto^{-1})	$2,3973 \times 10^9$	$1,9605 \times 10^8$
E_a $\left(\frac{\text{kJ}}{\text{mol}}\right)$	72,7932	65,8619

Com o valor de $R = 8,3144 \frac{\text{J}}{\text{mol K}}$ calcula-se a energia de ativação E_a . A

Tabela 4.21 mostra os valores da energia de ativação e os valores do fator de

frequência k_0 .

Para a temperatura de 62 °C, verificou-se que o modelo mais adequado para representar a estabilidade térmica da bromelina pura é de ordem dois. Neste modelo a equação (3.24), resultante do balanço molar, tem o termo r da velocidade de reação dado por $r = k_i C_E^2$. Portanto, resulta que:

$$\frac{dC_E}{d\theta} = -k_i C_E^2 \quad (4.37)$$

Desenvolvendo a equação (4.37) e expressando a concentração de enzima em termos de atividade, chega-se à equação (4.38).

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{A_0} + k_i \theta \quad (4.38)$$

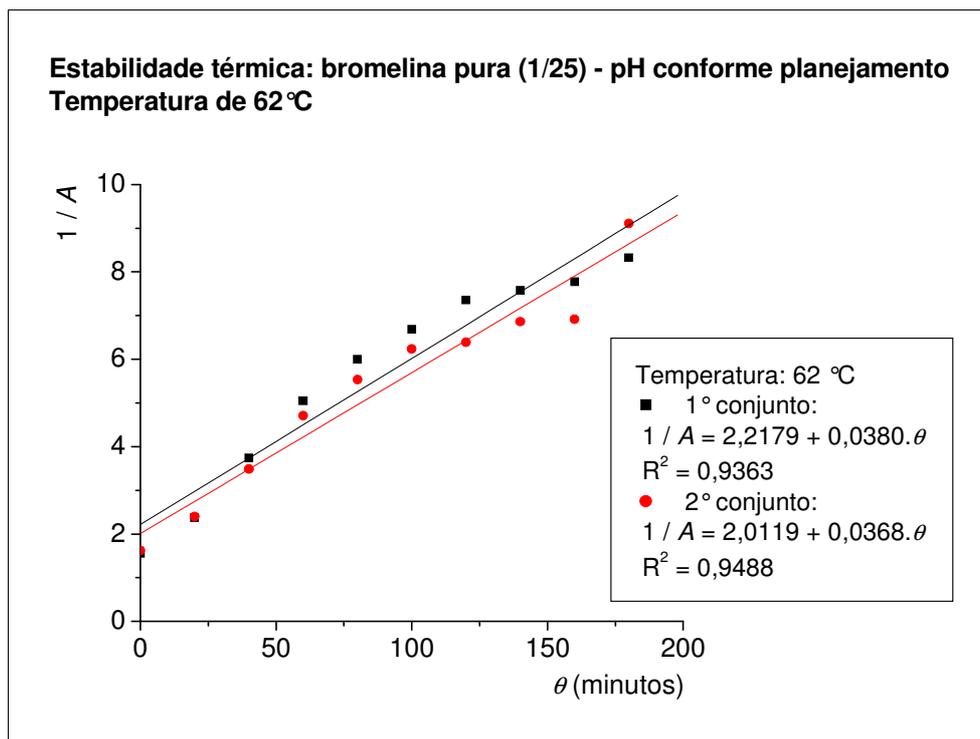


Figura 4.36 – Gráfico de $\frac{1}{A}$ em função do tempo θ para estabilidade térmica da bromelina pura 1 / 25, pH do planejamento, temperatura 62 °C.

Com os resultados de atividade encontrados para 62 °C, constantes nas Tabelas 4.18 e 4.19, construiu-se o gráfico de $\frac{1}{A}$ em função do tempo θ ,

conforme mostra a Figura 4.36. Os coeficientes de correlação mostram, para os dois conjuntos de ensaios, que o modelo de ordem dois pode ser considerado adequado para representar a decomposição térmica da bromelina pura a 62 °C. Observa-se também que as constantes de inativação k_i ficaram próximas (0,0380 e $0,0368 \frac{L}{mmol}$). A literatura consultada também considera que para a bromelina pura, pH = 7, e temperaturas acima de 60 °C, o mais adequado é um modelo de ordem maior que um (WINNICK *et al*, 1940, *apud* SRIWATANAPONGSE, BALABAN & TEIXEIRA, 2000).

4.4.2 Estabilidade térmica do extrato base relação 1 / 25: pH conforme o planejamento

Foram efetuados dois conjuntos de ensaios obtendo-se, para cada um, nove pontos ao longo de 180 minutos.

Tabela 4.22 – Estabilidade térmica: extrato base 1 / 25. pH conforme planejamento: primeiro conjunto de ensaios.

Tempo (minutos)	Atividade $\left(\frac{mmol \text{ tirosina}}{L \text{ min}} \right)$				
	Temperatura (°C)				
	25	35	44	53	62
0	0,2038	0,3306	0,4186	0,4871	0,4401
20	0,1778	0,3381	0,4103	0,5103	0,4535
40	0,1967	0,3516	0,4128	0,5035	0,4207
60	0,2116	0,3579	0,4272	0,5080	0,4188
80	0,2144	0,3526	0,4203	0,5070	0,3691
105	0,2083	0,3302	0,4192	0,5059	0,3292
130	0,2116	0,3577	0,4691	0,5159	0,3031
155	0,2125	0,3692	0,5120	0,5310	0,2638
180	0,2042	0,3808	0,4781	0,5274	0,2819

Preparou-se o extrato para dez pontos, sendo que a quantidade correspondente a um ponto foi utilizada para determinação do branco. As Tabelas 4.22 e 4.23 mostram os resultados obtidos.

Tabela 4.23 – Estabilidade térmica: extrato base 1 / 25. pH conforme planejamento: segundo conjunto de ensaios.

Tempo (minutos)	Atividade $\left(\frac{\text{mmol tirosina}}{\text{L min}} \right)$				
	Temperatura (°C)				
	25	35	44	53	62
0	0,3524	0,4076	0,4746	0,4966	0,5729
20	0,3372	0,3495	0,4880	0,5291	0,5442
40	0,3894	0,3875	0,4710	0,5378	0,5264
60	0,3855	0,3630	0,4582	0,5271	0,5172
80	0,3651	0,3788	0,4635	0,5216	0,5070
105	0,3487	0,3798	0,4776	0,5324	0,5534
130	0,3327	0,3965	0,4993	0,5326	0,5118
155	0,4437	0,3554	0,4835	0,5388	0,5514
180	0,3605	0,4008	0,4877	0,5627	0,4783

Para verificar se o modelo corresponde aos resultados, construiu-se o gráfico $-\ln\left(\frac{A}{A_0}\right)$ em função do tempo θ . As Figuras 4.37 e 4.38 mostram estes gráficos. Os resultados das Tabelas 4.22 e 4.23 e os gráficos das Figuras 4.37 e 4.38 mostram uma oscilação em torno da atividade inicial. Esta oscilação pode ser atribuída muito mais ao método analítico para os ensaios com extrato (que incluiu a absorbância do branco e posterior diluição adicional, conforme já discutido no item 4.3.2), do que ao fenômeno de inativação térmica. Portanto, os resultados obtidos não permitem afirmar que a enzima presente no extrato é estável ao longo do tempo nas condições estudadas, mas sim que a oscilação em torno da atividade inicial não possibilitou identificar o fenômeno.

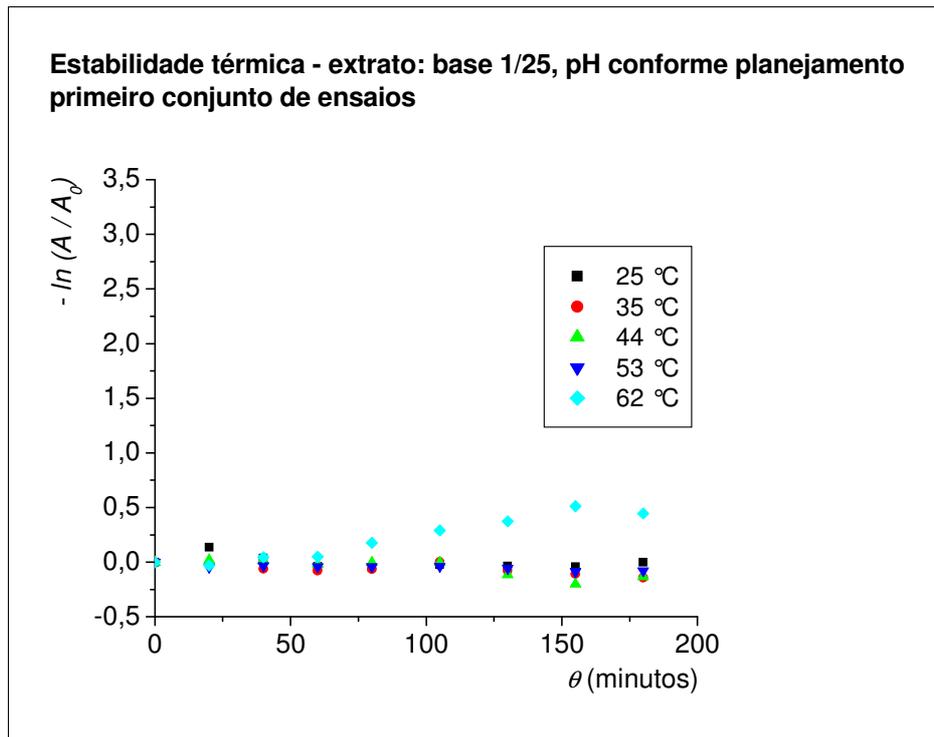


Figura 4.37 – Gráfico $-\ln\left(\frac{A}{A_0}\right)$ em função de θ para o extrato base 1 / 25 conforme pH do planejamento: primeiro conjunto de ensaios.

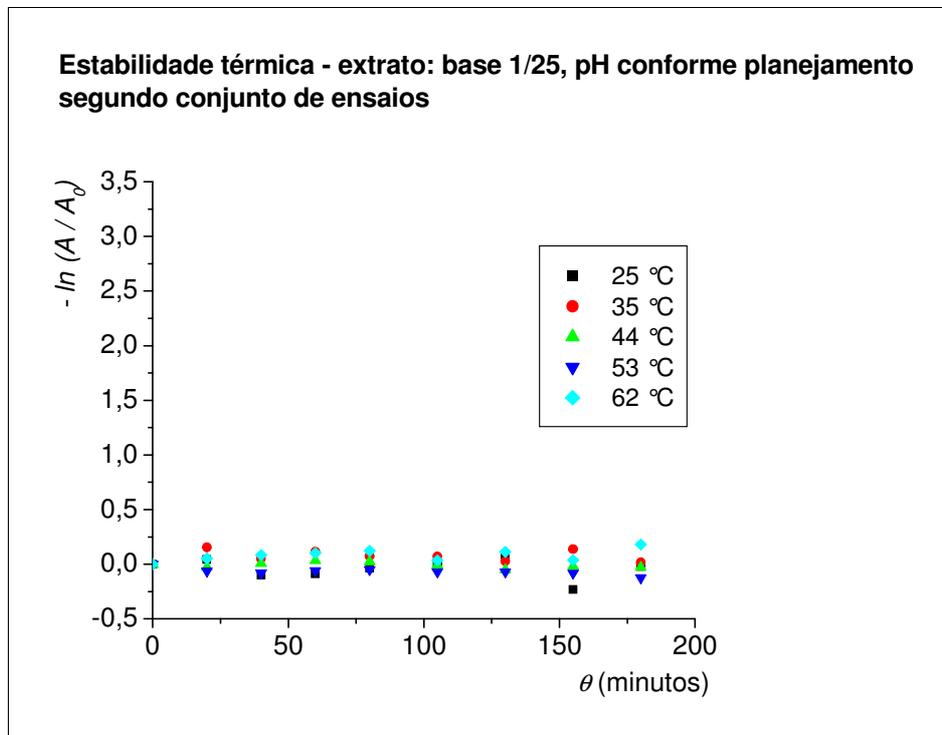


Figura 4.38 – Gráfico $-\ln\left(\frac{A}{A_0}\right)$ em função de θ para o extrato base 1 / 25 conforme pH do planejamento: segundo conjunto de ensaios.

Pelo resultado do planejamento experimental para o extrato base relação 1 / 25 (item 4.3.2.1), onde foi observada uma taxa de aumento de atividade decrescente parecida com o resultado do planejamento experimental para a bromelina pura (item 4.3.1.1), pode-se esperar a desativação térmica da enzima presente no extrato com valores baixos da constante de inativação. No gráfico da Figura 4.37, referente ao primeiro conjunto de ensaios, é perceptível uma perda de atividade a 62 °C, que não se repete no segundo conjunto de ensaios.

4.4.3 Estabilidade térmica da bromelina pura relação 1 / 25: pH entre 3,3 e 3,5

Foram efetuados dois conjuntos de ensaios obtendo-se, para cada um, dez pontos ao longo de 180 minutos. As Tabelas 4.24 e 4.25 mostram os resultados obtidos.

Tabela 4.24 – Estabilidade térmica: bromelina pura 1 / 25. pH entre 3,3 e 3,5: primeiro conjunto de ensaios.

Tempo (minutos)	Temperatura (°C)				
	25	35	44	53	62
0	0,2120	0,3066	0,4598	0,5534	0,2156
20	0,2062	0,2908	0,3828	0,2361	0,0505
40	0,2126	0,2752	0,3274	0,1361	0,0450
60	0,2049	0,2711	0,2941	0,1069	0,0399
80	0,1980	0,2699	0,2537	0,0925	0,0400
100	0,2135	0,2580	0,2323	0,0865	0,0394
120	0,2005	0,2554	0,2002	0,0832	0,0401
140	0,1950	0,2502	0,1716	0,0782	0,0409
160	0,1952	0,2432	0,1558	0,0766	0,0412
180	0,1971	0,2426	0,1407	0,0741	0,0444

Tabela 4.25 – Estabilidade térmica: bromelina pura 1 / 25. pH entre 3,3 e 3,5: segundo conjunto de ensaios.

Tempo (minutos)	Atividade $\left(\frac{\text{mmol tirosina}}{\text{L min}} \right)$				
	Temperatura (°C)				
	25	35	44	53	62
0	0,1365	0,2543	0,4524	0,5385	0,3302
20	0,1366	0,2416	0,3844	0,2332	0,0869
40	0,1295	0,2248	0,3424	0,1350	0,0471
60	0,1267	0,2176	0,3119	0,0988	0,0471
80	0,1261	0,2160	0,2840	0,0876	-
100	0,1238	0,2037	0,2661	0,0737	-
120	0,1273	0,1983	0,2365	0,0691	-
140	0,1268	0,1986	0,2220	0,0645	-
160	0,1243	0,1924	0,2052	0,0641	-
180	0,1244	0,1857	0,1836	0,0669	-

Como para o primeiro conjunto de ensaios observou-se que a 62 °C a atividade cai para valores muito baixos logo no início (indicando desativação da enzima) decidiu-se, para esta temperatura, fazer o segundo conjunto de ensaios até 60 minutos.

De modo a verificar se o modelo corresponde aos resultados construiu-se o gráfico $-\ln\left(\frac{A}{A_0}\right)$ em função do tempo θ ; as Figuras 4.39 e 4.40 mostram estes gráficos.

Para as temperaturas 53 °C e 62 °C verifica-se que, após certo tempo, as atividades caem para valores baixos e próximos entre si, atingindo um patamar, indicando desativação da enzima; portanto, os gráficos foram construídos eliminando os pontos correspondentes ao patamar.

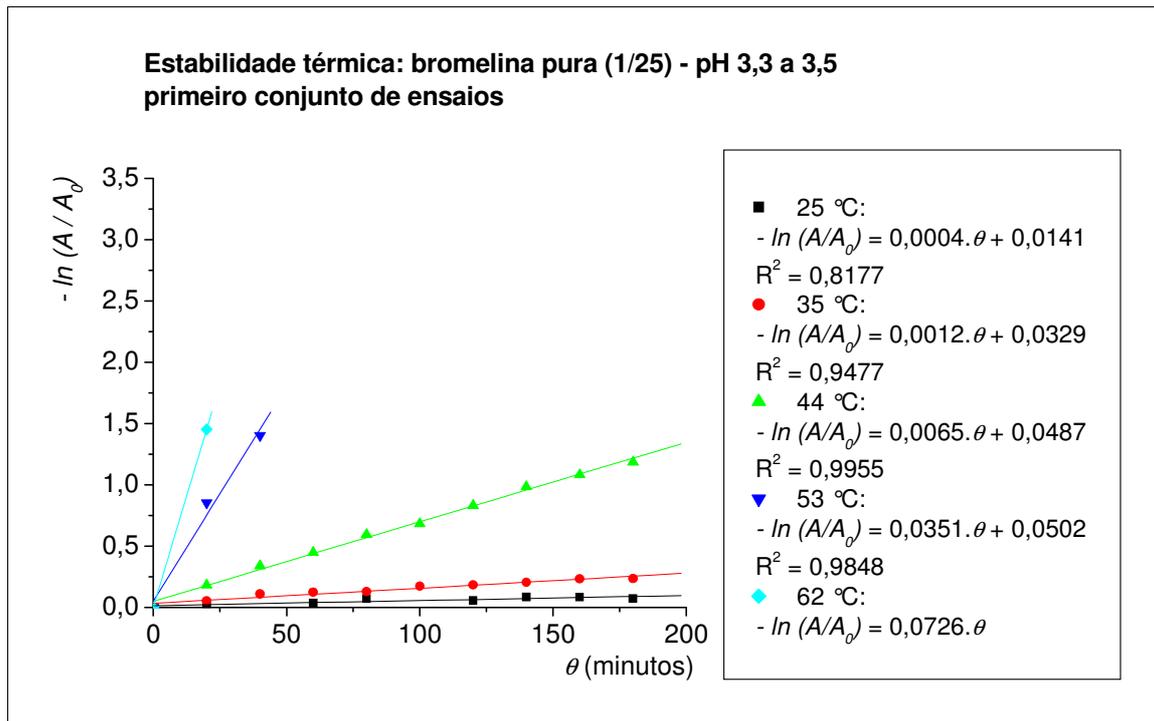


Figura 4.39 – Gráfico $-\ln\left(\frac{A}{A_0}\right)$ em função de θ para bromelina pura 1 / 25 e pH entre 3,3 e 3,5: primeiro conjunto de ensaios.

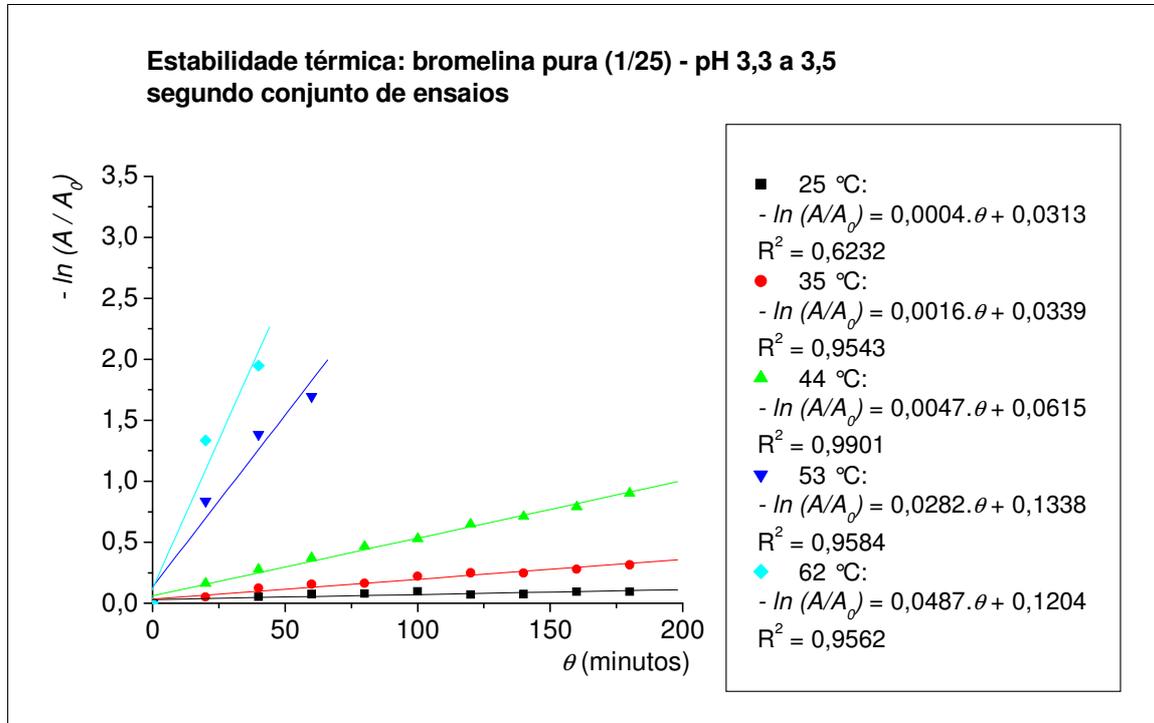


Figura 4.40 – Gráfico $-\ln\left(\frac{A}{A_0}\right)$ em função de θ para bromelina pura 1 / 25 e pH entre 3,3 e 3,5: segundo conjunto de ensaios.

No gráfico da Figura 4.39 o patamar foi atingido após 20 minutos na temperatura de 62 °C restando, portanto, apenas dois pontos (inicial e 20 minutos) para a construção da linha de tendência, não havendo então sentido em calcular o valor do coeficiente de correlação (R^2). Apesar de determinada com apenas dois pontos, a constante de inativação k_i para 62 °C foi considerada porque se alinha com as constantes para as demais temperaturas na determinação da energia de ativação, como será visto mais adiante.

Os gráficos mostram que o modelo de ordem um é adequado para representar a desativação da enzima, uma vez que os resultados experimentais concordaram com a dependência de $-\ln\left(\frac{A}{A_0}\right)$ em função de θ . Conforme já discutido no item 4.4.1, as equações apresentadas junto aos gráficos estão na forma: $-\ln\left(\frac{A}{A_0}\right) = k_i \theta + b$. Para os valores de b , pode-se considerar o termo $e^{-b} \cong 1$, e, portanto, $-\ln\left(\frac{A}{A_0}\right) \cong k_i \theta$. A Tabela 4.26 mostra os valores de k_i encontrados.

Tabela 4.26 – Valores da constante de inativação k_i para bromelina pura relação 1 / 25 e pH entre 3,3 e 3,5.

Temperatura (°C)	Constante de inativação k_i ($minuto^{-1}$)	
	1º conjunto de ensaios	2º conjunto de ensaios
25	0,0004	0,0004
35	0,0012	0,0016
44	0,0065	0,0047
53	0,0351	0,0282
62	0,0726	0,0487

Considerando a dependência de k_i com a temperatura conforme a equação de Arrhenius, pelo gráfico de $\ln k_i$ em função de $\frac{1}{T}$ pode-se obter a

energia de ativação E_a , como mostra a Figura 4.41. Observa-se no gráfico, pelos valores do coeficiente de correlação, que o modelo de Arrhenius é adequado para descrever a dependência da constante de inativação com a temperatura.

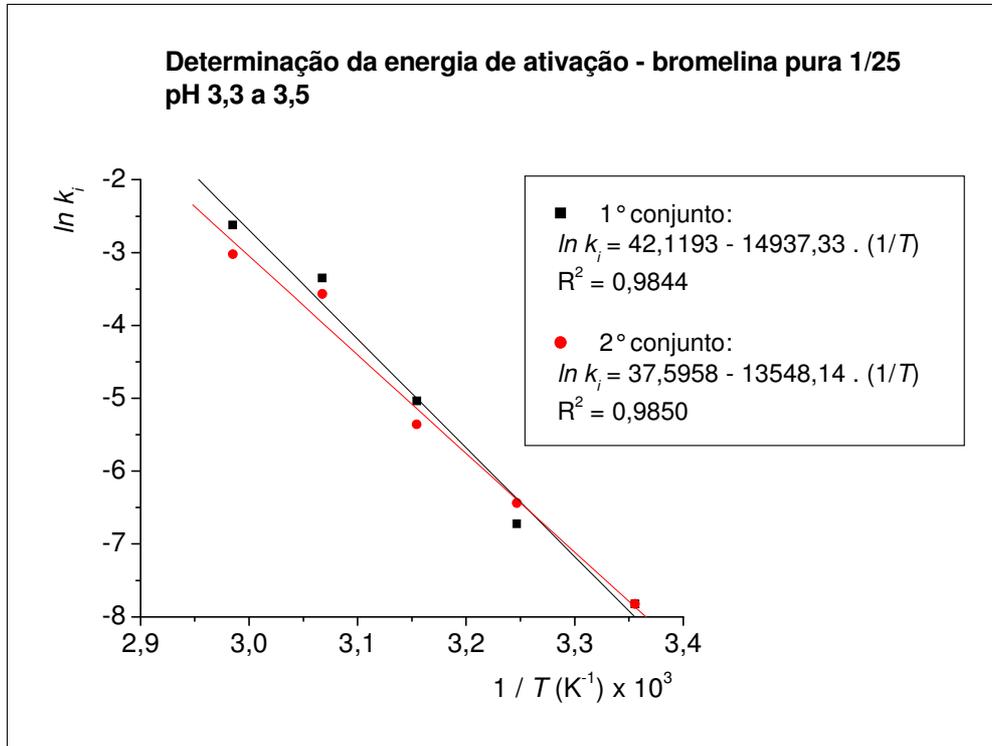


Figura 4.41 – Gráfico de $\ln k_i$ em função de $\frac{1}{T}$ para bromelina pura relação 1 / 25 e pH entre 3,3 e 3,5.

Com o valor de $R = 8,3144 \frac{J}{mol K}$ calcula-se a energia de ativação E_a . A

Tabela 4.27 mostra os valores da energia de ativação e os valores do fator de frequência k_0 .

Tabela 4.27 – Valores da energia de ativação e do fator de frequência para bromelina pura, relação 1 / 25 e pH entre 3,3 e 3,5.

	1º conjunto de ensaios	2º conjunto de ensaios
k_0 (minuto ⁻¹)	$1,9597 \times 10^{18}$	$2,1264 \times 10^{16}$
E_a $\left(\frac{kJ}{mol} \right)$	124,1949	112,6447

ARROYO-REYNA & HERNANDEZ-ARANA (1995) ensaiaram, em pH 3,4, a desnaturação térmica da bromelina purificada em laboratório encontrando o valor de $E_a = (181 \pm 35) \left(\frac{kJ}{mol} \right)$, e $k_0 = 5,2 \times 10^{28} (\text{minuto}^{-1})$. Tomando a temperatura do ponto central do planejamento (35 °C) como referência, a constante de inativação calculada com estes valores é $k_i = 0,0105 (\text{minuto}^{-1})$, enquanto que a calculada com os valores intermediários de E_a e k_0 encontrados (Tabela 4.27) é $k_i = 0,0082 (\text{minuto}^{-1})$.

4.4.4 Estabilidade térmica do extrato base relação 1 / 25: pH entre 3,3 e 3,5

Foram efetuados dois conjuntos de ensaios com nove pontos cada, ao longo de 180 minutos. O extrato foi preparado para dez pontos, sendo que a quantidade correspondente a um ponto foi utilizada para determinação do branco.

Durante ensaios iniciais exploratórios, observou-se que a 62 °C a atividade enzimática é nula logo no primeiro ponto de leitura (tempo zero). À temperatura menor (57 °C), a atividade encontrada em dois ensaios foi de 0,5422 e de 0,5091 $\left(\frac{mmol \text{ tirosina}}{L \text{ min}} \right)$ no tempo zero, e nula a partir de 20 minutos.

Decidiu-se, portanto, efetuar os ensaios com as temperaturas: 25 °C, 35 °C, 44 °C e 53 °C, introduzindo a temperatura intermediária de 49 °C.

Na temperatura de 53 °C, no primeiro conjunto de ensaios, a atividade calculada apresentou valores negativos a partir de 105 minutos. Estes valores negativos, próximos de zero, deve-se ao método analítico para os ensaios com extrato (que incluiu a absorbância do branco, conforme discutido no item 4.3.2), quer dizer, a enzima já perdeu a atividade e o valor lido corresponde a alguma variação na leitura do branco. Em vista do exposto, o segundo conjunto de ensaios a 53 °C foi feito até 105 minutos, e chegou a apresentar valor negativo também para a atividade a 80 minutos. Os valores de atividade para a temperatura de 25 °C e de 35 °C apresentaram-se em torno do valor inicial, não mostrando a

tendência de queda esperada no caso da desativação térmica. Assim, os gráficos de $-\ln\left(\frac{A}{A_0}\right)$ em função do tempo θ , para verificar se o modelo de ordem um corresponde aos resultados, foram construídos sem considerar os valores para 25 °C e 35 °C. Com estas considerações, têm-se três curvas, correspondentes às temperaturas 44 °C, 49 °C e 53 °C. De modo a obter a energia de ativação com maior número de pontos foram introduzidos ensaios a 47 °C e 51 °C. As Tabelas 4.28 e 4.29 mostram os resultados obtidos.

Observa-se que, para a temperatura de 51 °C, nos primeiros ensaios foram encontradas atividades negativas a partir de 130 minutos e, no segundo conjunto, foi atingido um patamar a partir deste mesmo tempo, indicando que a enzima já se decompôs. Assim, para a temperatura de 51 °C os gráficos foram construídos com os pontos até 105 minutos. As Figuras 4.42 e 4.43 mostram os gráficos de $-\ln\left(\frac{A}{A_0}\right)$ em função do tempo θ para o extrato, pH entre 3,3 e 3,5.

Tabela 4.28 – Estabilidade térmica: extrato base 1 / 25. pH entre 3,3 e 3,5: primeiro conjunto de ensaios.

Tempo (minutos)	Atividade $\left(\frac{\text{mmol tirosina}}{\text{L min}}\right)$						
	Temperatura (°C)						
	25	35	44	47	49	51	53
0	0,3081	0,4434	0,4812	0,5306	0,5450	0,5080	0,5165
20	0,3043	0,4396	0,4709	0,4770	0,4932	0,4065	0,4444
40	0,3086	0,4403	0,4528	0,4228	0,4211	0,3159	0,2212
60	0,3045	0,4409	0,4279	0,4176	0,3411	0,1991	0,0617
80	0,3022	0,4308	0,4249	0,3963	0,2587	0,1030	0,0168
105	0,3261	0,4458	0,3848	0,3280	0,1773	0,0194	- 0,0315
130	0,3138	0,4293	0,3611	0,3115	0,0995	- 0,0046	- 0,0384
155	0,3133	0,4341	0,3409	0,2630	0,0551	- 0,0156	- 0,0344
180	0,3186	0,4212	0,3436	0,2227	0,0405	- 0,0106	- 0,0380

Tabela 4.29 – Estabilidade térmica: extrato base 1 / 25. pH entre 3,3 e 3,5: segundo conjunto de ensaios.

Tempo (minutos)	Atividade $\left(\frac{\text{mmol tirosina}}{\text{L min}}\right)$						
	Temperatura (°C)						
	25	35	44	47	49	51	53
0	0,2467	0,3030	0,5887	0,5958	0,5596	0,5208	0,5666
20	0,2542	0,3009	0,5685	0,5338	0,4785	0,3852	0,3980
40	0,2612	0,3012	0,5436	0,4635	0,4092	0,2430	0,2276
60	0,2539	0,3037	0,5410	0,4086	0,3330	0,1396	0,0380
80	0,2550	0,3124	0,5358	0,3586	0,2443	0,0789	- 0,0150
105	0,2580	0,3115	0,5244	0,2771	0,1680	0,0511	- 0,0202
130	0,2583	0,3049	0,5053	0,2267	0,1081	0,0561	-
155	0,2569	0,3133	0,4919	0,1350	0,0560	0,0431	-
180	0,2582	0,3127	0,4650	0,1143	0,0448	0,0636	-

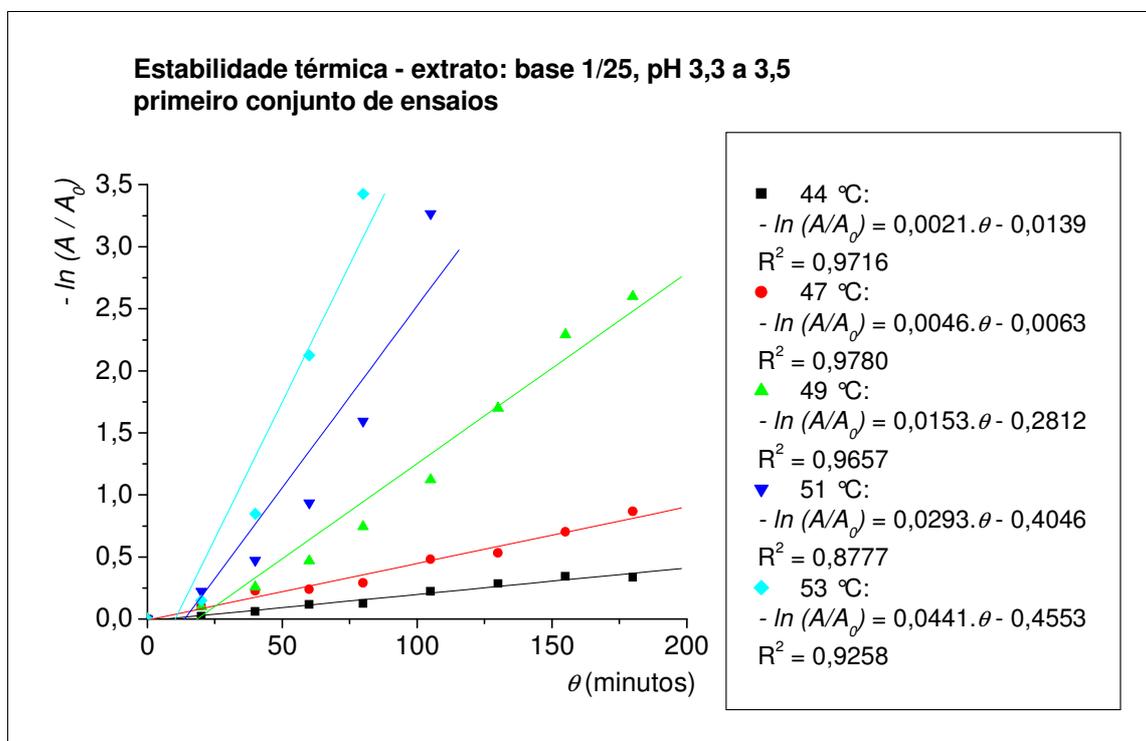


Figura 4.42 – Gráfico $-\ln\left(\frac{A}{A_0}\right)$ em função de θ para o extrato base 1 / 25 e pH entre 3,3 e 3,5: primeiro conjunto de ensaios.

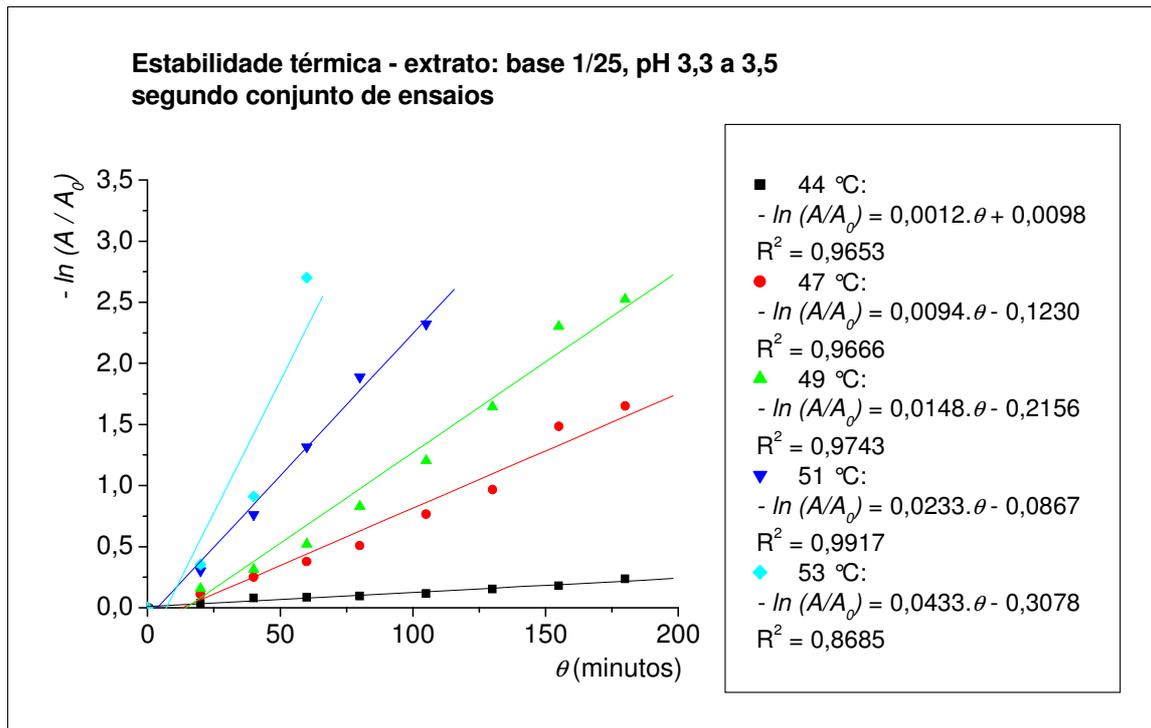


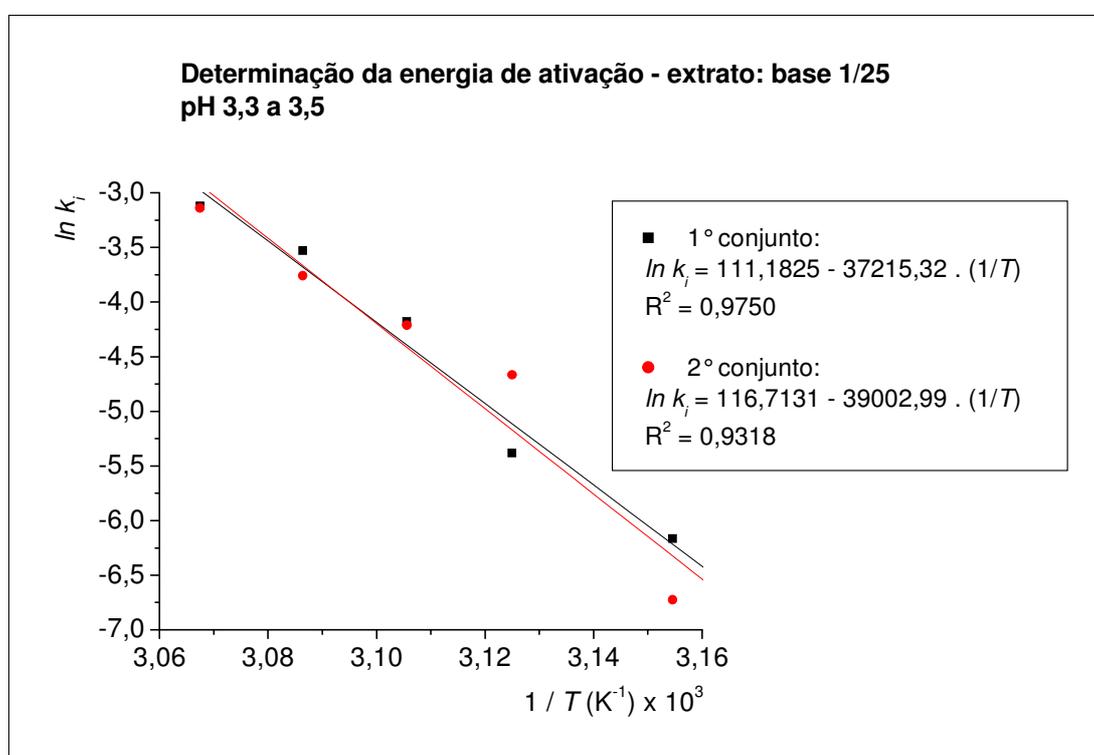
Figura 4.43 – Gráfico $-\ln\left(\frac{A}{A_0}\right)$ em função de θ para o extrato base 1 / 25 e pH entre 3,3 e 3,5: segundo conjunto de ensaios.

Os gráficos nas Figuras 4.42 e 4.43 mostram que os resultados apresentam um desvio com relação ao modelo de ordem um, menos acentuado para a temperatura de 44 °C. As equações, na forma $-\ln\left(\frac{A}{A_0}\right) = k_i \theta + b$, apresentam valores de b tais que para a temperatura de 44 °C o termo $e^{-b} \cong 1$, enquanto que para as demais, $e^{-b} \neq 1$. Entretanto, a literatura consultada considera o modelo de ordem um para representar o fenômeno com resultados experimentais apresentando desvios semelhantes; inclusive a forma da curva é semelhante aos resultados experimentais obtidos (ver Figura 2.7). A Tabela 4.30 mostra os valores de k_i encontrados.

Pela construção do gráfico de $\ln k_i$ em função de $\frac{1}{T}$ pode-se obter a energia de ativação E_a , como mostra a Figura 4.44. Observa-se no gráfico, pelos valores do coeficiente de correlação, que o modelo de Arrhenius é adequado para descrever a dependência da constante de inativação com a temperatura.

Tabela 4.30 – Valores da constante de inativação k_i para o extrato base 1 / 25 e pH entre 3,3 e 3,5.

Temperatura (°C)	Constante de inativação k_i ($minuto^{-1}$)	
	1º conjunto de ensaios	2º conjunto de ensaios
44	0,0021	0,0012
47	0,0046	0,0094
49	0,0153	0,0148
51	0,0293	0,0233
53	0,0441	0,0433

Figura 4.44 – Gráfico de $\ln k_i$ em função de $\frac{1}{T}$ para o extrato base 1 / 25 e pH entre 3,3 e 3,5.

Com o valor de $R = 8,3144 \frac{J}{mol K}$ calcula-se a energia de ativação E_a . A

Tabela 4.31 mostra os valores da energia de ativação e os valores do fator de frequência k_0 . Está incluído na Tabela 4.31, para efeito comparativo, o resultado

obtido por SRIWATANAPONGSE, BALABAN & TEIXEIRA (2000) referente ao fruto *Smooth Cayenne pineapple*, adquirido localmente e testado na Universidade da Flórida. Observa-se que os valores obtidos estão próximos ao da literatura citada.

Tabela 4.31 – Valores da energia de ativação e do fator de frequência para o extrato base relação 1 / 25 e pH entre 3,3 e 3,5.

	1° conjunto de ensaios	2° conjunto de ensaios	Literatura (*)
k_0 ($minuto^{-1}$)	$1,9317 \times 10^{48}$	$4,8737 \times 10^{50}$	$1,37 \times 10^{50}$
E_a ($\frac{kJ}{mol}$)	309,4231	324,2865	326

(*) SRIWATANAPONGSE, BALABAN & TEIXEIRA (2000).

4.4.5 Comparativo entre os ensaios de estabilidade térmica

Quanto à estabilidade térmica, os resultados encontrados mostram que o modelo de ordem um é adequado para descrevê-la, tanto com relação à bromelina pura como para a encontrada no extrato. Portanto, a enzima contida no extrato da casca e do talo do abacaxi estudado (variedade pérola) apresenta o mesmo comportamento verificado para a bromelina proveniente de outras fontes (HAYASHI & IKADA, 1991; ARROYO-REYNA & HERNANDEZ –ARANA, 1995; SRIWATANAPONGSE, BALABAN & TEIXEIRA, 2000; LI & LIN, 2001; YODOYA et al., 2003).

Tabela 4.32 – Valores intermediários da energia de ativação e do fator de frequência para os ensaios de estabilidade térmica.

(valores intermediários)	Bromelina pura		Extrato	
	pH conforme planejamento	pH entre 3,3 e 3,5	pH conforme planejamento	pH entre 3,3 e 3,5
k_0 ($minuto^{-1}$)	$1,2967 \times 10^9$	$9,9048 \times 10^{17}$	(*)	$2,4465 \times 10^{50}$
E_a ($\frac{kJ}{mol}$)	69,3276	118,4198	(*)	316,8548

(*) não foi possível identificar a desativação da enzima.

Para comparar a estabilidade térmica entre a bromelina pura e aquela contida no extrato nas condições de pH e temperatura estudados, foi considerada a energia de ativação e o fator de frequência gerados pelo gráfico de $\ln k_i$ em função de $\frac{1}{T}$. Como os resultados, em cada caso, foram próximos, considerou-se o valor intermediário, de modo a permitir uma comparação mais clara. A Tabela 4.32 mostra os valores intermediários para cada caso estudado.

Considerando a teoria das colisões (SMITH, 1970), na equação de Arrhenius $\left(k_i = k_0 e^{-\frac{E_a}{RT}} \right)$ o termo k_0 pode ser interpretado como o número de colisões por unidade de tempo, e o termo $e^{-\frac{E_a}{RT}}$ como a fração das colisões que envolve moléculas com a energia necessária para reagir. Segundo esta teoria, os valores da Tabela 4.32 mostram que quando reduzimos o pH aumentamos o choque entre as moléculas de bromelina, fenômeno mais acentuado para a bromelina presente no extrato. Isto pode ser entendido se for admitido que a maior quantidade de íons H^+ produz uma conformação tal na molécula que facilita o choque entre elas. Já os termos exponenciais, comparados à mesma temperatura, mostram que a fração de moléculas com energia para reagir diminui com o aumento da quantidade de íons H^+ . Cabe observar que, de acordo com a teoria das colisões, k_0 também varia com a temperatura, porém esta dependência é proporcional a \sqrt{T} , desprezível frente a dependência exponencial com T apresentada pela fração das colisões que envolve moléculas com a energia necessária para reagir.

Com base nesta argumentação, a decomposição mais acentuada verificada para valores de pH entre 3,3 e 3,5 deve-se ao aumento no choque entre as moléculas da enzima. Para o extrato com pH de acordo com o planejamento pode-se admitir que a energia de ativação é elevada de modo que a fração de moléculas que se chocam e têm energia para reagir é muito pequena, resultando na maior estabilidade da enzima com a temperatura.

A comparação entre o extrato e a bromelina pura no pH entre 3,3 e 3,5

mostra que a enzima contida no extrato perde atividade mais rapidamente que a bromelina pura. Este fato deve-se ao valor de k_0 ser $2,4607 \times 10^{32}$ vezes maior para a enzima do extrato.

O modelo considerado para a cinética de decomposição da enzima (equação 3.22) pressupõe uma reação elementar unimolecular ($r = k_i C_E$), isto é, a molécula desativa-se por um fenômeno inerente a ela, sem interferência de outras moléculas. Entretanto, pode-se também admitir como modelo uma reação elementar bimolecular envolvendo a enzima e a água ($r = k_i C_E C_{H_2O}$), com a enzima se decompondo por uma reação de hidrólise, que seria mais acentuada com a elevação da temperatura e maior presença de íons H^+ , que atuaria como catalisador conforme ilustra a Figura 4.45. Neste caso, como a quantidade de água presente é muito maior que a enzima, sua concentração seria constante e o modelo considerado de pseudo primeira ordem, resultando nas mesmas equações utilizadas para o tratamento dos resultados.

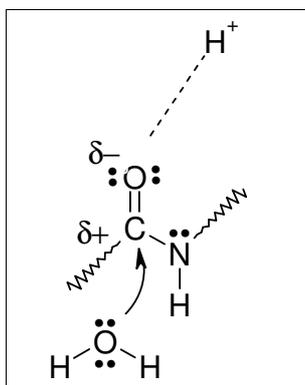


Figura 4.45 – Ação catalítica dos íons H^+ na inativação da enzima pelo mecanismo de hidrólise

4.5 Cinética da hidrólise enzimática

A cinética da hidrólise enzimática foi estudada para a bromelina pura nas relações enzima / substrato de 1 / 25, 1 / 50 e 1 / 125; e para o extrato nas relações base 1 / 25, 1 / 50 e 1 / 125.

A temperatura utilizada foi de 35 °C (ponto central do planejamento experimental), mantida constante neste valor. Os ensaios foram efetuados com o

pH de máxima atividade, definido pela equação do pH ótimo obtida nos planejamentos experimentais (item 4.3). A Tabela 4.33 mostra os valores de pH calculados para cada caso. Para os ensaios admitiu-se variação de pH entre $-0,1$ e $+0,1$, que resulta em variação desprezível da atividade enzimática, conforme comentado no item 4.4.

Tabela 4.33 – Valores de pH utilizados nos ensaios da cinética de hidrólise enzimática.

	Relação enzima / substrato	pH
Bromelina pura	1 / 25	6,6
	1 / 50	6,0
	1 / 125	6,8
Extrato	base 1 / 25	6,1
	base 1 / 50	6,4
	base 1 / 125	6,9

Os ensaios consistiram em retirar alíquotas do meio reacional ao longo do tempo e determinar a concentração dos produtos gerados pela hidrólise, expressos em mmol de tirosina por litro. Para cada relação enzima / substrato, tanto para bromelina pura quanto para o extrato, os ensaios foram efetuados em triplicata. Como os resultados foram similares para cada relação, no texto apresenta-se o gráfico para o primeiro conjunto de ensaios, e os demais em Apêndice.

A cinética foi estudada considerando a velocidade inicial de hidrólise da caseína preparada em diversas concentrações. Como já citado no item 3.15: o aplicativo Microcal Origin 6.0 fez o ajuste sigmoidal das curvas e calculou a derivada no ponto tempo zero.

Como já comentado no item 4.3.2, para o extrato na relação base 1 / 25, cuja quantidade necessária para cada ensaio ficou acima de 20 g, o volume adicionado foi de 50 mL, e a dispersão de caseína, preparada com o dobro da concentração prevista na Tabela 3.5, foi de 25 mL. Também, a quantidade de substâncias detectáveis a 280 nm presentes no extrato excedeu o limite de leitura,

portanto, foi necessário fazer uma diluição adicional das alíquotas retiradas tanto do branco quanto do ensaio com caseína, avolumando-as de 5 mL para 25 mL.

4.5.1 Cinética da hidrólise para a relação 1 bromelina pura / 25 caseína

Foram efetuados três conjuntos de ensaios cujos resultados foram colocados na forma de um gráfico da concentração de produtos gerados na hidrólise, expressos em tirosina, em função do tempo. A Figura 4.46, e as Figuras 4.47 e 4.48 apresentadas no Apêndice XI, mostram os gráficos obtidos, onde constam os pontos experimentais e a curva ajustada, da qual calcularam-se as velocidades iniciais.

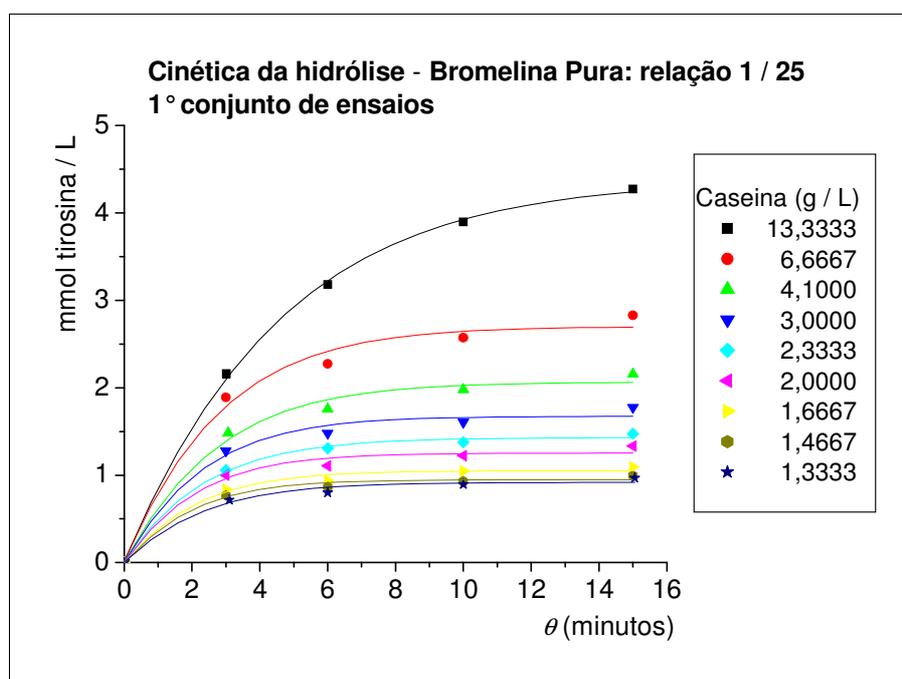


Figura 4.46 – Concentração de tirosina em função do tempo para bromelina pura, relação 1 / 25: 1º conjunto de ensaios.

A Tabela 4.34 mostra as concentrações de caseína com a respectiva velocidade inicial, calculada pelo aplicativo, para cada conjunto de ensaios. Como visto na revisão bibliográfica, a literatura cita que a ação da bromelina segue o modelo de Michaelis - Menten. Para verificar se os resultados experimentais se ajustam a este modelo, foi construído o gráfico de Lineweaver - Burk, que consiste no inverso da velocidade inicial ($1 / v$) em função do inverso da concentração do

substrato caseína ($1 / C_S$), conforme mostra a Figura 4.49. Com base na equação (2.15), obtém-se a velocidade máxima V_{max} e a constante K_m .

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max} C_S} \quad (2.15)$$

Tabela 4.34 – Velocidade inicial para bromelina pura, relação 1 / 25.

Concentração de caseína. $\left(\frac{mmol}{L}\right)$	Ensaio bromelina pura, relação 1 / 25		
	Velocidade inicial $\left(\frac{mmol \text{ tirosina}}{L \text{ min}}\right)$		
	1° conjunto	2° conjunto	3° conjunto
0,5749	0,8492	0,7722	0,8470
0,2875	0,8019	0,7451	0,8002
0,1768	0,6296	0,5874	0,6088
0,1294	0,5897	0,5468	0,6020
0,1006	0,5133	0,4700	0,5085
0,0862	0,4776	0,4257	0,4567
0,0719	0,3989	0,3616	0,3984
0,0632	0,3730	0,3456	0,3973
0,0575	0,3248	0,3249	0,3547

Os valores dos coeficientes de correlação mostram que o modelo de Michaelis - Menten é adequado para representar a cinética da ação da bromelina pura na relação 1 / 25. Pelo gráfico da Figura 4.49, obtém-se os valores de V_{max} e a constante K_m , apresentados na Tabela 4.35.

Tabela 4.35 – Valores de V_{max} e K_m para bromelina pura, relação 1 / 25.

ensaio	$V_{max} \left(\frac{mmol \text{ tirosina}}{L \text{ min}}\right)$	$K_m \left(\frac{mmol \text{ caseína}}{L}\right)$
1° conjunto	1,1606	0,1365
2° conjunto	1,0138	0,1221
3° conjunto	1,0513	0,1106

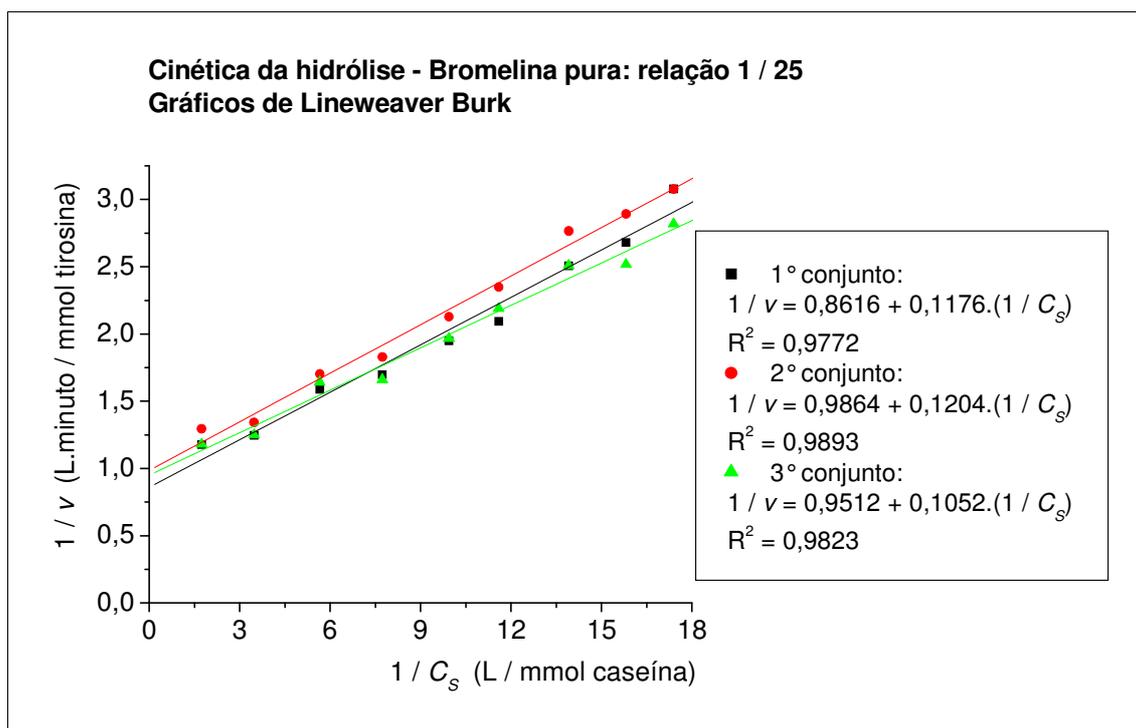


Figura 4.49 – Gráfico de $1 / v$ em função de $1 / C_s$ para bromelina pura, relação 1 / 25.

4.5.2 Cinética da hidrólise para a relação 1 bromelina pura / 50 caseína

A exemplo do que foi feito para a bromelina pura relação 1 / 25, foram efetuados três conjuntos de ensaios e os resultados colocados na forma de um gráfico da concentração de produtos gerados na hidrólise, expressos em tirosina, em função do tempo. A Figura 4.50 e as Figuras 4.51 e 4.52 apresentadas no Apêndice XII mostram os gráficos obtidos, onde constam os pontos experimentais e a curva ajustada, da qual calcularam-se as velocidades iniciais. A formação de material detectável a 280 nm foi menor quando comparada com a relação 1 / 25, portanto, na construção dos gráficos a escala correspondente à concentração foi reduzida para zero a 3,5 mmol tirosina / L com objetivo de proporcionar melhor visualização das curvas. A Tabela 4.36 mostra as concentrações de caseína com a respectiva velocidade inicial, calculada pelo aplicativo, para cada conjunto de ensaios. Foi construído o gráfico de Lineweaver - Burk: $(1 / v)$ em função do inverso da concentração do substrato caseína $(1 / C_s)$, conforme mostra a Figura 4.53, de onde foi obtida a velocidade máxima V_{max} e a constante K_m .

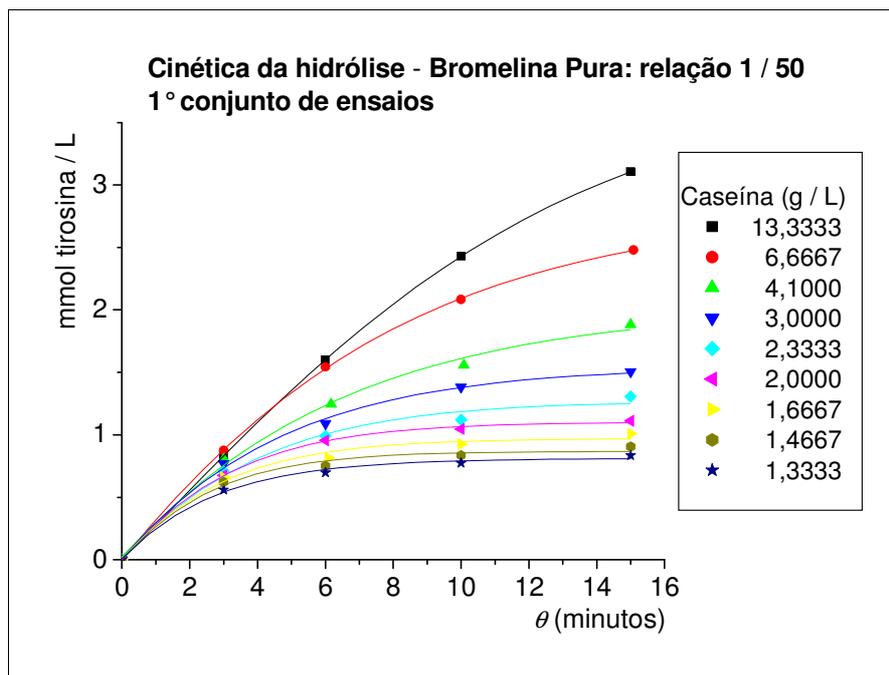


Figura 4.50 – Concentração de tirosina em função do tempo para bromelina pura, relação 1 / 50: 1° conjunto de ensaios.

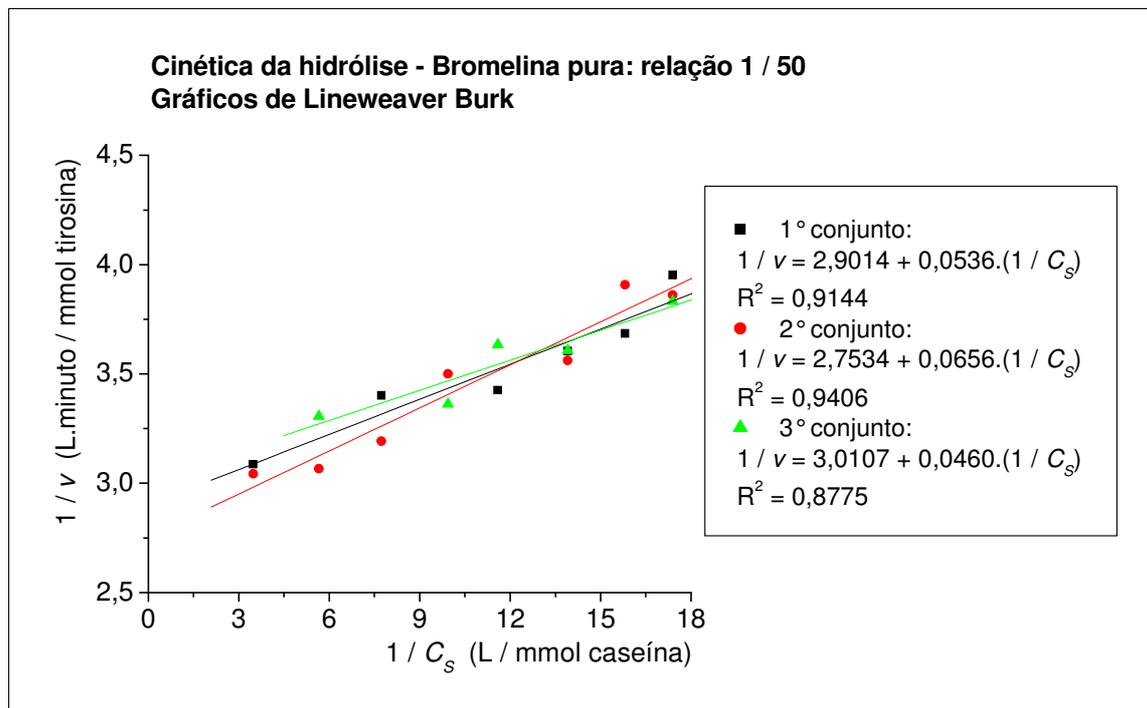


Figura 4.53 – Gráfico de $1 / v$ em função de $1 / C_s$ para bromelina pura, relação 1 / 50.

Os valores dos coeficientes de correlação mostram que o modelo de Michaelis - Menten é adequado para representar a cinética da ação da bromelina pura na relação 1 / 50, e os valores obtidos para V_{max} e K_m estão apresentados

na Tabela 4.37.

Tabela 4.36 – Velocidade inicial para bromelina pura, relação 1 / 50.

Ensaio bromelina pura, relação 1 / 50			
Concentração de caseína. $\left(\frac{mmol}{L}\right)$	Velocidade inicial $\left(\frac{mmol\text{ tirosina}}{L\text{ min}}\right)$		
	1° conjunto	2° conjunto	3° conjunto
0,5749	0,2791	0,3135	0,2583
0,2875	0,3240	0,3287	0,2977
0,1768	0,2832	0,3261	0,3025
0,1294	0,2940	0,3133	0,3568
0,1006	0,2703	0,2858	0,2974
0,0862	0,2919	0,2567	0,2752
0,0719	0,2774	0,2808	0,2772
0,0632	0,2714	0,2560	0,2897
0,0575	0,2530	0,2591	0,2609

A velocidade inicial deve diminuir conforme a concentração de caseína diminui. Na construção do gráfico para cada conjunto de ensaios os valores muito discrepantes com esta tendência foram excluídos, admitindo-se algum erro experimental. Deve-se considerar também que a formação de material detectável a 280 nm é menor quando comparado com os ensaios na relação enzima / substrato 1 / 25, tornando o resultado mais sensível às imprecisões do método analítico, especialmente para as concentrações baixas de caseína.

Tabela 4.37 – Valores de V_{max} e K_m para bromelina pura, relação 1 / 50.

ensaio	$V_{max} \left(\frac{mmol\text{ tirosina}}{L\text{ min}}\right)$	$K_m \left(\frac{mmol\text{ caseína}}{L}\right)$
1° conjunto	0,3447	0,0185
2° conjunto	0,3632	0,0238
3° conjunto	0,3321	0,0153

4.5.3 Cinética da hidrólise para a relação 1 bromelina pura / 125 caseína

A exemplo do que foi feito nas relações anteriores para a bromelina pura, foram efetuados três conjuntos de ensaios e os resultados colocados na forma de um gráfico da concentração de produtos gerados na hidrólise, expressos em tirosina, em função do tempo. A Figura 4.54, e as Figuras 4.55 e 4.56 apresentadas no Apêndice XIII, mostram os gráficos obtidos, onde constam os pontos experimentais e a curva ajustada, da qual calcularam-se as velocidades iniciais. Como a formação de material detectável a 280 nm foi menor quando comparada com as relações anteriores, a escala correspondente à concentração foi reduzida para zero a 2,5 mmol tirosina / L para melhor visualização das curvas.

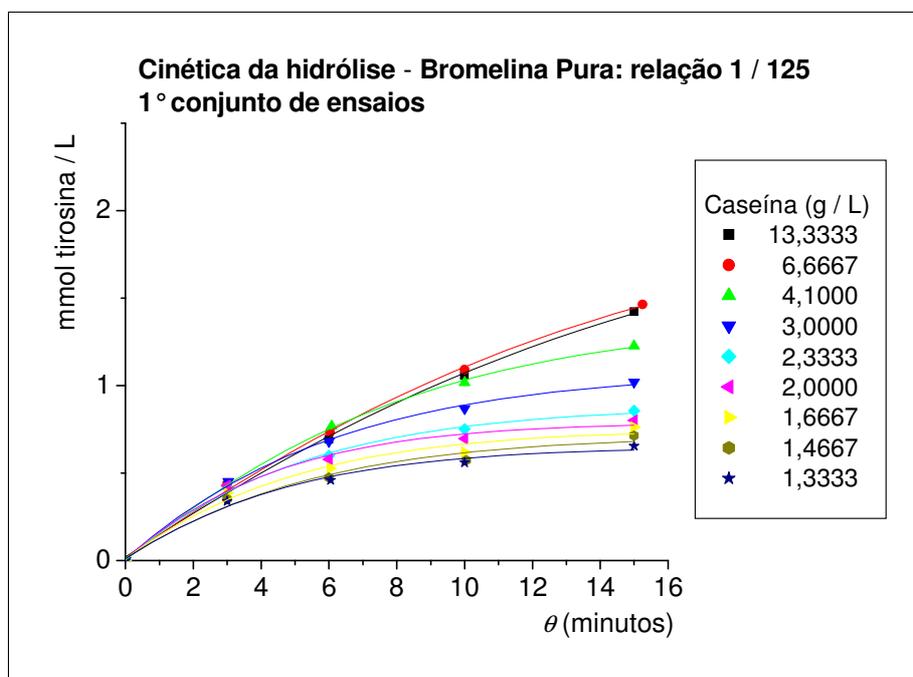


Figura 4.54 – Concentração de tirosina em função do tempo para bromelina pura, relação 1 / 125: 1º conjunto de ensaios.

A Tabela 4.38 mostra as concentrações de caseína com a respectiva velocidade inicial, calculada pelo aplicativo, para cada conjunto de ensaios. A Figura 4.57 mostra o gráfico de Lineweaver - Burk: $(1 / v)$ em função do inverso da concentração do substrato caseína $(1 / C_S)$, de onde foi obtida a velocidade máxima V_{max} e a constante K_m , apresentados na Tabela 4.39. Os valores dos

coeficientes de correlação podem ser considerados adequados para admitir o modelo de Michaelis - Menten como representativo da cinética da ação da bromelina pura na relação 1 / 125.

Tabela 4.38 – Velocidade inicial para bromelina pura, relação 1 / 125.

Ensaio bromelina pura, relação 1 / 125			
Concentração de caseína. $\left(\frac{mmol}{L}\right)$	Velocidade inicial $\left(\frac{mmol\text{ tirosina}}{L\text{ min}}\right)$		
	1° conjunto	2° conjunto	3° conjunto
0,5749	0,1271	0,1138	0,1787
0,2875	0,1346	0,1145	0,1766
0,1768	0,1570	0,1299	0,2174
0,1294	0,1620	0,1571	0,2124
0,1006	0,1533	0,1465	0,1698
0,0862	0,1554	0,1394	0,1734
0,0719	0,1324	0,1136	0,1663
0,0632	0,1154	0,2344	0,1565
0,0575	0,1185	(*)	0,1641

(*) ensaio perdido

Tabela 4.39 – Valores de V_{max} e K_m para bromelina pura, relação 1 / 125.

ensaio	$V_{max}\left(\frac{mmol\text{ tirosina}}{L\text{ min}}\right)$	$K_m\left(\frac{mmol\text{ caseína}}{L}\right)$
1° conjunto	0,2668	0,0744
2° conjunto	0,3170	0,1215
3° conjunto	0,2900	0,0543

A velocidade inicial deve diminuir conforme a concentração de caseína diminui. Na construção do gráfico para cada conjunto de ensaios, os valores muito discrepantes com esta tendência foram excluídos, admitindo-se algum erro

experimental. Para esta relação enzima / substrato deve-se levar em consideração que a formação de material detectável a 280 nm é ainda menor, quando comparada com os ensaios na relação enzima / substrato 1 / 25 e 1 / 50, tornando o resultado bem mais sensível às imprecisões do método analítico, em especial para as concentrações baixas de caseína.

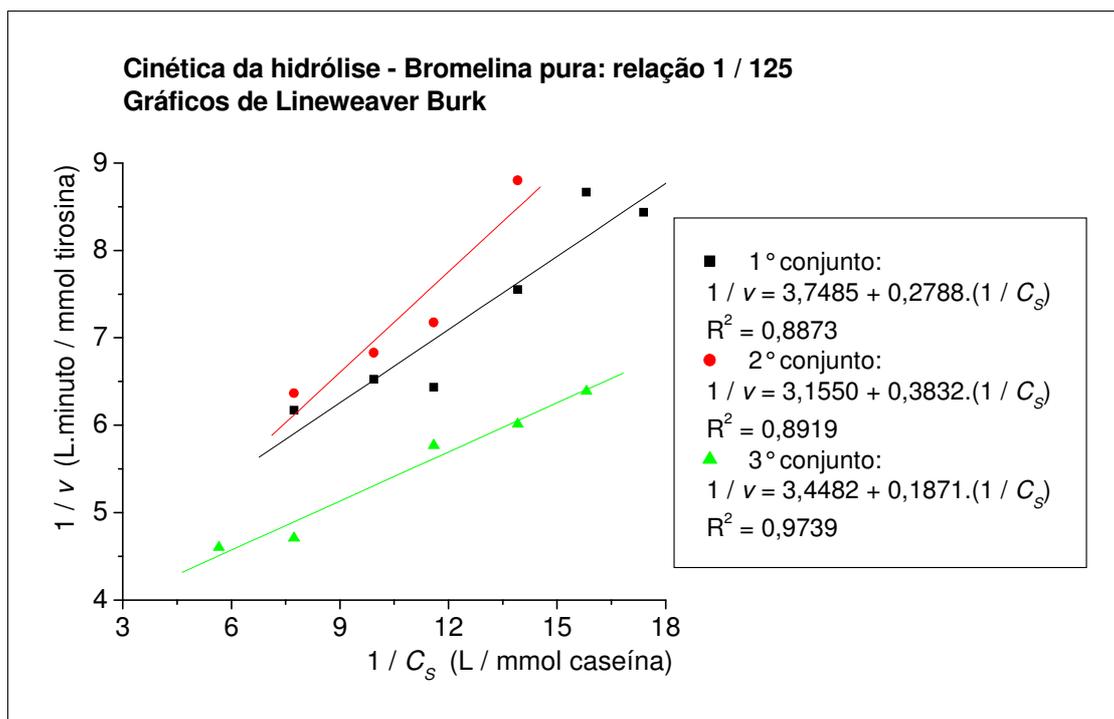


Figura 4.57 – Gráfico de $1/v$ em função de $1/C_s$ para bromelina pura, relação 1 / 125.

4.5.4 Cinética da hidrólise para o extrato: relação base 1 enzima / 25 caseína

Para o extrato, a rotina foi a mesma empregada para a bromelina pura: foram efetuados três conjuntos de ensaios e os resultados colocados na forma de um gráfico da concentração de produtos gerados na hidrólise, expressos em tirosina, em função do tempo. A Figura 4.58, e as Figuras 4.59 e 4.60 apresentadas no Apêndice XIV, mostram os gráficos obtidos, onde constam os pontos experimentais e a curva ajustada, da qual calcularam-se as velocidades iniciais.

A Tabela 4.40 mostra as concentrações de caseína com a respectiva

velocidade inicial, calculada pelo aplicativo, para cada conjunto de ensaios.

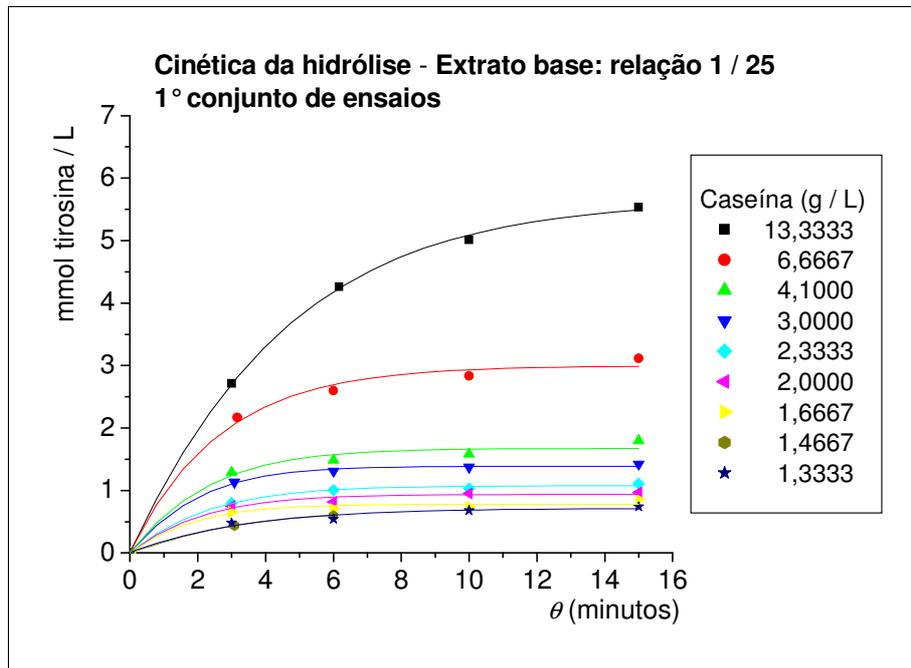


Figura 4.58 – Concentração de tirosina em função do tempo para o extrato, relação base 1 / 25: 1º conjunto de ensaios.

Tabela 4.40 – Velocidade inicial para o extrato, relação base 1 / 25.

Concentração de caseína. $\left(\frac{mmol}{L}\right)$	Ensaio extrato, relação base 1 / 25		
	Velocidade inicial $\left(\frac{mmol\ tirosina}{L\ min}\right)$		
	1º conjunto	2º conjunto	3º conjunto
0,5749	1,0882	1,3538	1,4167
0,2875	0,9617	1,1645	1,1902
0,1768	0,5973	0,8035	0,8924
0,1294	0,5422	0,5565	0,7357
0,1006	0,3897	0,3709	0,3254
0,0862	0,3574	0,3518	0,3393
0,0719	0,3292	0,3552	0,2588
0,0632	0,1784	0,0545	0,2901
0,0575	0,1837	0,1040	0,2031

A Figura 4.61 mostra o gráfico de Lineweaver - Burk: $(1 / v)$ em função do inverso da concentração do substrato caseína $(1 / C_S)$, de onde foi obtida a velocidade máxima V_{max} e a constante K_m , apresentados na Tabela 4.41. O terceiro conjunto de ensaios foi excluído, uma vez que ele indica valor negativo para a velocidade inicial.

Os valores dos coeficientes de correlação podem ser considerados adequados para admitir o modelo de Michaelis - Menten como representativo da cinética da ação da enzima contida no extrato, na relação base 1 / 25.

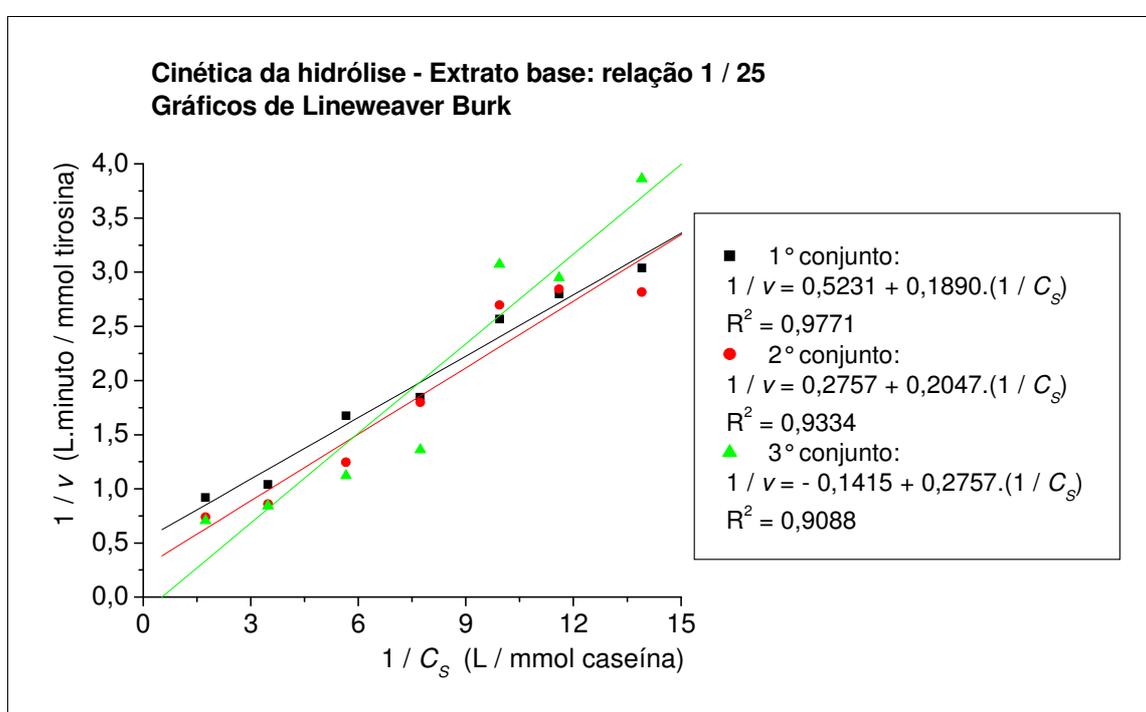


Figura 4.61 – Gráfico de $1 / v$ em função de $1 / C_S$ para o extrato, relação base 1 / 25.

Para a construção dos gráficos da Figura 4.61 foram excluídos os dois últimos pontos, referentes a menor concentração de caseína, visto que a velocidade inicial foi incompatível com a tendência mostrada pelos primeiros sete pontos. Estes resultados considerados incompatíveis podem ser explicados pela baixa concentração de caseína, resultando em pouca formação de material detectável a 280 nm, isto é, havendo pouca formação de material detectável a 280 nm o resultado fica mais sensível às imprecisões do método analítico que, no caso do extrato do fruto, inclui a elaboração do branco e, para o extrato relação

base 1 / 25, a posterior diluição da amostra de 5 para 25 mL antes da leitura de absorbância.

Tabela 4.41 – Valores de V_{max} e K_m para o extrato, relação base 1 / 25

ensaio	$V_{max} \left(\frac{mmol \text{ tirosina}}{L \text{ min}} \right)$	$K_m \left(\frac{mmol \text{ caseína}}{L} \right)$
1° conjunto	1,9117	0,3613
2° conjunto	3,6271	0,7425

4.5.5 Cinética da hidrólise para o extrato: relação base 1 enzima / 50 caseína

Foram efetuados três conjuntos de ensaios e os resultados colocados na forma de um gráfico da concentração de produtos gerados na hidrólise, expressos em tirosina, em função do tempo. A Figura 4.62, e as Figuras 4.63 e 4.64 apresentadas no Apêndice XV, mostram os gráficos obtidos, onde constam os pontos experimentais e a curva ajustada, da qual calcularam-se as velocidades iniciais.

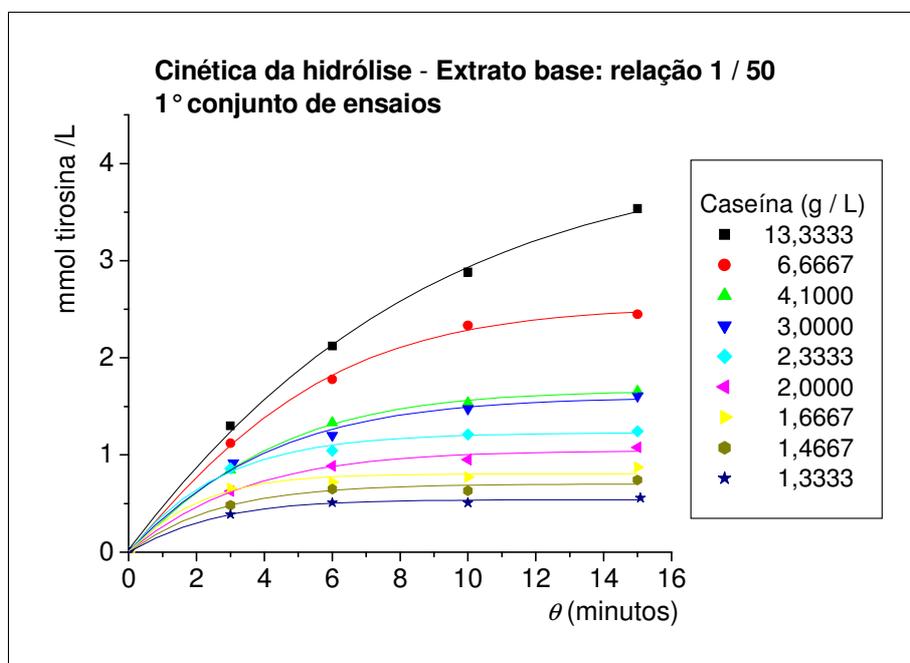


Figura 4.62 – Concentração de tirosina em função do tempo para o extrato, relação base 1 / 50: 1° conjunto de ensaios.

A formação de material detectável a 280 nm foi menor quando comparada com o extrato relação base 1 / 25, portanto, a escala correspondente à concentração foi reduzida para zero a 4,5 mmol tirosina / L com objetivo de proporcionar melhor visualização das curvas. A Tabela 4.42 mostra as concentrações de caseína com a respectiva velocidade inicial, calculada pelo aplicativo, para cada conjunto de ensaios.

Tabela 4.42 – Velocidade inicial para o extrato, relação base 1 / 50.

Concentração de caseína. $\left(\frac{mmol}{L}\right)$	Ensaio extrato, relação base 1 / 50		
	Velocidade inicial $\left(\frac{mmol\ tirosina}{L\ min}\right)$		
	1° conjunto	2° conjunto	3° conjunto
0,5749	0,4473	0,6056	0,4150
0,2875	0,4010	0,5365	0,3868
0,1768	0,3318	0,4754	0,4321
0,1294	0,3388	0,3751	0,3377
0,1006	0,3895	0,3508	0,3065
0,0862	0,2634	0,2920	0,2233
0,0719	0,3184	0,2640	0,1848
0,0632	0,2285	0,2314	0,1826
0,0575	0,1802	0,1562	0,1611

A velocidade máxima V_{max} e a constante K_m , apresentados na Tabela 4.43, foram obtidos da Figura 4.65 (gráfico de Lineweaver - Burk). Os valores dos coeficientes de correlação podem ser considerados adequados para admitir o modelo de Michaelis - Menten como representativo da cinética da ação da enzima contida no extrato, na relação base 1 / 50.

Na construção destes gráficos foram excluídos dois pontos para o primeiro e um ponto para o segundo e o terceiro conjunto de ensaios. Estes pontos excluídos não correspondem à constante queda da velocidade inicial, esperada

conforme diminuem as concentrações iniciais de caseína. Para esta relação base 1 / 50 a quantidade de extrato adicionada foi 50 % menor quando comparada com a relação base 1 / 25, portanto, a interferência de materiais detectáveis a 280 nm originários do extrato, que justificam a elaboração do branco, foi 50 % menor, o que explica os resultados melhores, ou seja, valores de V_{max} e de K_m mais próximos entre si quando comparados com os valores encontrados para a relação base 1 / 25.

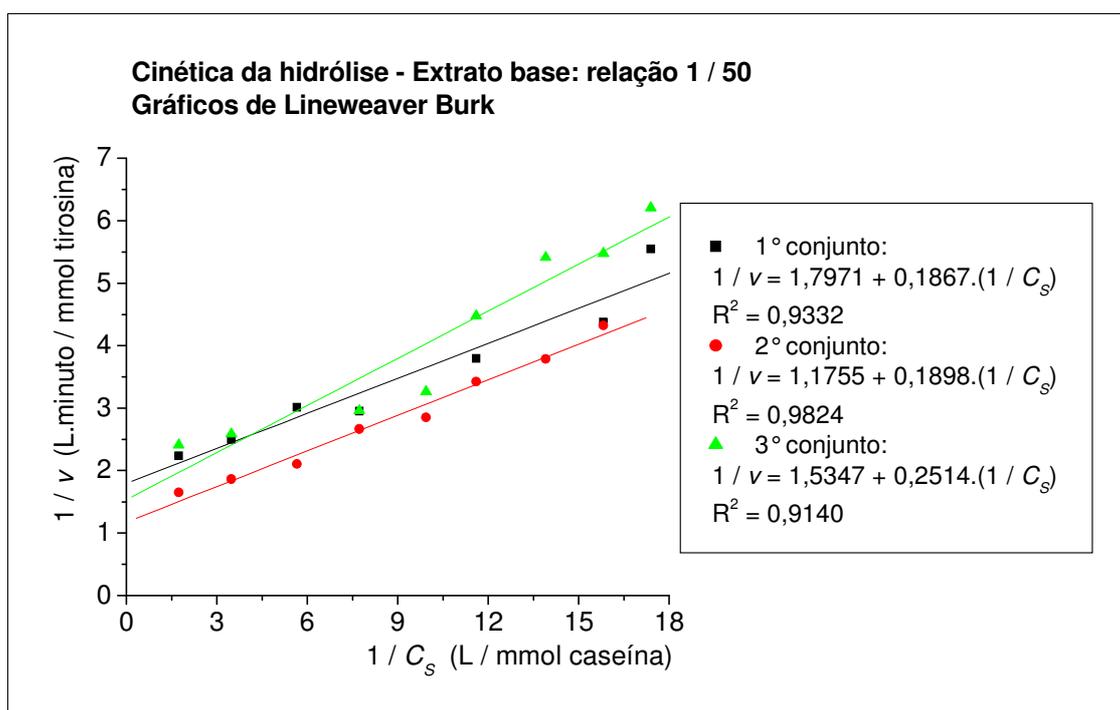


Figura 4.65 – Gráfico de $1 / v$ em função de $1 / C_s$ para o extrato, relação base 1 / 50.

Tabela 4.43 – Valores de V_{max} e K_m para o extrato, relação base 1 / 50

ensaio	$V_{max} \left(\frac{mmol \text{ tirosina}}{L \text{ min}} \right)$	$K_m \left(\frac{mmol \text{ caseína}}{L} \right)$
1º conjunto	0,5565	0,1039
2º conjunto	0,8507	0,1615
3º conjunto	0,6516	0,1638

4.5.6 Cinética da hidrólise para o extrato: relação base 1 enzima / 125 caseína

Foram efetuados dois conjuntos de ensaios e os resultados colocados na forma de um gráfico da concentração de produtos gerados na hidrólise, expressos em tirosina, em função do tempo.

As Figuras 4.66 e 4.67 mostram os gráficos obtidos, onde constam os pontos experimentais e a curva ajustada, da qual calcularam-se as velocidades iniciais. A formação de material detectável a 280 nm foi bem menor quando comparada com o extrato relação base 1 / 25 e 1 / 50, portanto, a escala correspondente à concentração foi reduzida para zero a 1,5 mmol tirosina / L com objetivo de proporcionar melhor visualização das curvas.

A Tabela 4.44 mostra as concentrações de caseína com a respectiva velocidade inicial, calculada pelo aplicativo, para cada conjunto de ensaios.

Tabela 4.44 – Velocidade inicial para o extrato, relação base 1 / 125.

Concentração de caseína. $\left(\frac{mmol}{L}\right)$	Ensaio extrato, relação base 1 / 125. Velocidade inicial $\left(\frac{mmol\ tirosina}{L\ min}\right)$	
	1º conjunto	2º conjunto
0,5749	0,0685	0,0611
0,2875	0,0856	0,0710
0,1768	0,0939	0,0905
0,1294	0,0941	0,0963
0,1006	0,1043	0,1023
0,0862	0,1055	0,1017
0,0719	0,0920	0,1074
0,0632	0,0936	0,1095
0,0575	0,0963	0,1089

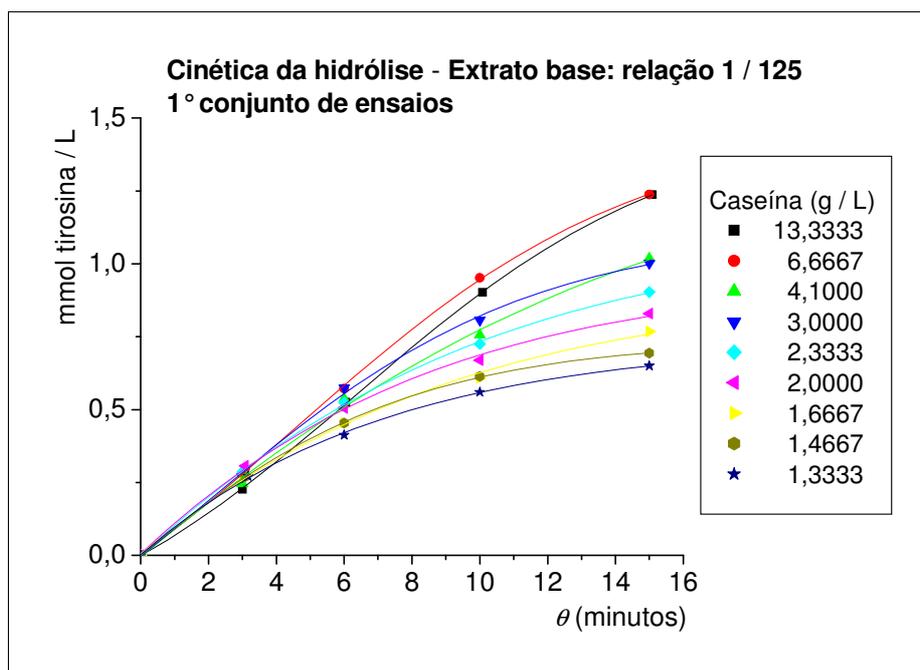


Figura 4.66 – Concentração de tirosina em função do tempo para o extrato, relação base 1 / 125: 1° conjunto de ensaios.

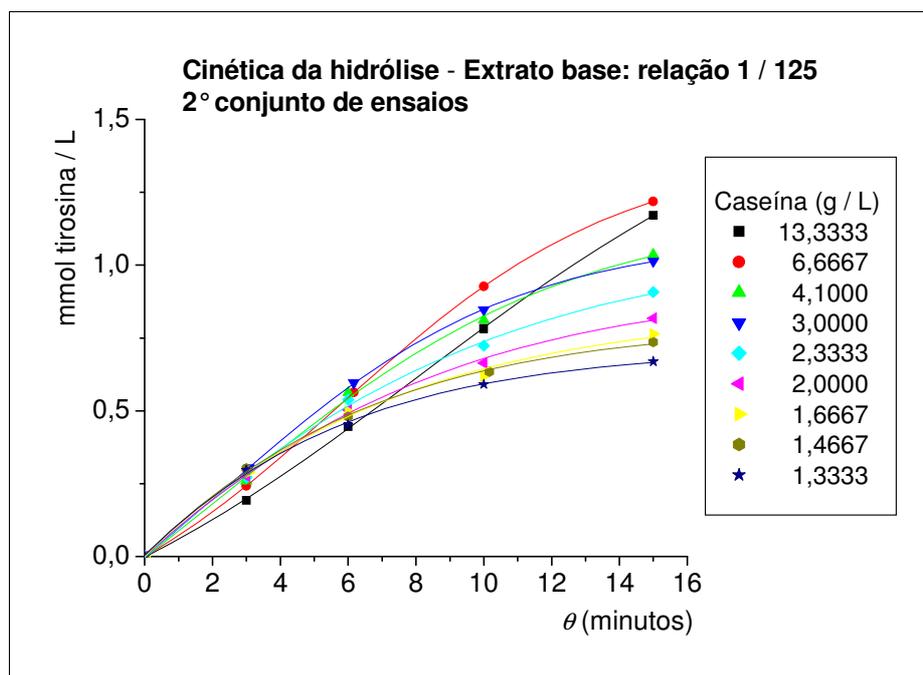


Figura 4.67 – Concentração de tirosina em função do tempo para o extrato, relação base 1 / 125: 2° conjunto de ensaios.

A Tabela 4.44 mostra que os valores da velocidade inicial não apresentaram a tendência de queda conforme a concentração de caseína diminuiu, como observado para o extrato nas relações enzima / substrato anteriores. Nota-

se que, com exceção aos valores correspondentes às duas primeiras concentrações de caseína, os valores da velocidade inicial ficaram em torno de

$0,1 \left(\frac{\text{mmol tirosina}}{\text{L min}} \right)$, o que corresponde a um patamar, como mostra o gráfico de

Lineweaver - Burk apresentado na Figura 4.68. Este comportamento pode ser explicado pela baixa formação de materiais detectáveis a 280 nm durante a hidrólise que, em conjunto com os materiais detectáveis originários do extrato (que justificam a elaboração do branco), interferem na precisão do método analítico. Em vista do exposto julgou-se desnecessária a realização do terceiro conjunto de ensaios. Não foi possível obter valores de V_{max} e K_m para o extrato, neste caso.

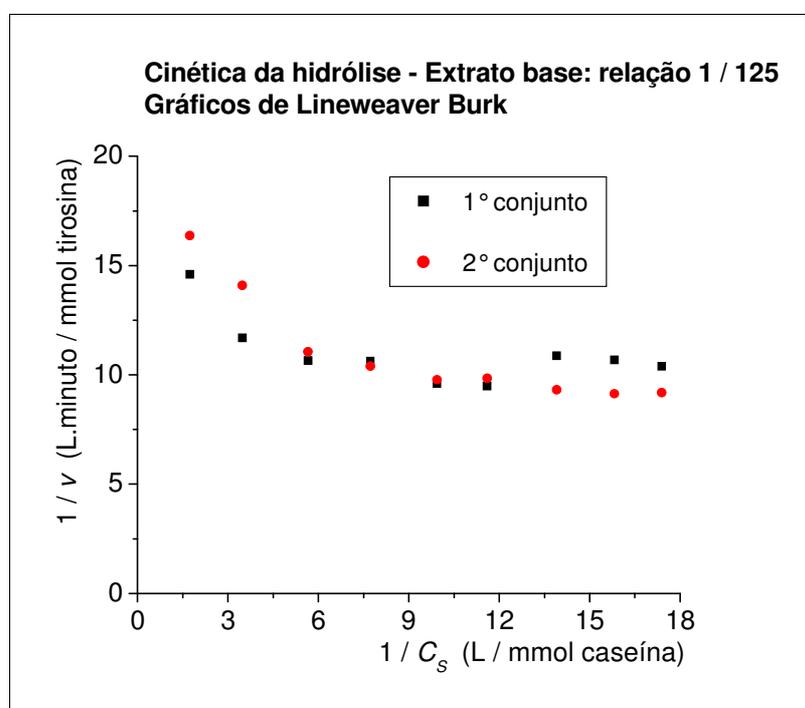


Figura 4.68 – Gráfico de $1 / v$ em função de $1 / C_s$ para o extrato, relação base 1 / 125.

4.5.7 Comparativo entre as cinéticas da hidrólise para as relações enzima / substrato estudadas

Com relação à cinética da hidrólise os resultados encontrados mostram que o modelo de Michaelis - Menten é adequado para descrevê-la, tanto com relação à bromelina pura como para a encontrada no extrato. Portanto, a enzima contida no extrato da casca e do talo do abacaxi estudado (variedade pérola)

apresenta o mesmo comportamento verificado para a bromelina proveniente de outras fontes, conforme consta na literatura: CHOI et al. (1992); GIL et al. (1995); GIL et al. (1997); HARRACH et al. (1995); HARRACH et al. (1998); HUNG et al. (2002); INOUE & NAGAI (2004); KHAN, RASHEEDI, & HAQ (2003); LIANG, HUANG & KWOK (2000); ROWAN, BUTTLE & BARRET (1988).

Tabela 4.45 – Atividades calculadas a partir dos ensaios para cinética.

	Relação enzima / substrato	Ensaio	Atividade $\left(\frac{\text{mmol tirosina}}{\text{L min}} \right)$	
				Valor médio
Bromelina pura	1 / 25	1° conjunto	0,3897	0,3835
		2° conjunto	0,3704	
		3° conjunto	0,3905	
	1 / 50	1° conjunto	0,2430	0,2396
		2° conjunto	0,2465	
		3° conjunto	0,2293	
	1 / 125	1° conjunto	0,1057	0,1212
		2° conjunto	0,1006	
		3° conjunto	0,1572	
Extrato	base 1 / 25	1° conjunto	0,5107	0,5281
		2° conjunto	0,5358	
		3° conjunto	0,5379	
	base 1 / 50	1° conjunto	0,2882	0,3172
		2° conjunto	0,3532	
		3° conjunto	0,3101	

O comparativo entre as cinéticas da hidrólise para as proporções enzima / substrato estudadas pode ser feito pelos valores encontrados para V_{max} e K_m . No caso da bromelina pura partiu-se de uma quantidade conhecida de enzima, enquanto que para o extrato foram feitos ensaios prévios de modo a

encontrar a massa que reproduzisse a atividade obtida no ensaio com bromelina pura correspondente.

Nos ensaios para verificar a cinética foi medida a formação de produtos durante 15 minutos, a partir de diversas dispersões de caseína, dentre elas a concentração de 20 g / L, que corresponde à concentração de 13,3333 g / L no meio reacional. Portanto, os resultados experimentais que geraram os gráficos da concentração de tirosina em função do tempo tem um ponto que corresponde à concentração de caseína e o tempo (10 minutos) adotado para determinação da atividade enzimática. As atividades calculadas a partir dos ensaios para a cinética estão na Tabela 4.45.

A Tabela 4.45 mostra que, para dada relação enzima / substrato, as atividades encontradas para o extrato foram maiores que as encontradas para a bromelina pura, significando que a massa de extrato poderia ter sido menor, uma vez que o objetivo foi adicionar a quantidade de extrato de modo a reproduzir a atividade encontrada para a bromelina pura. Esta diferença pode ser explicada por alguma discrepância entre os testes prévios de atividade para definir a quantidade de extrato e a quantidade efetivamente utilizada.

Com os valores de atividade da Tabela 4.45 é possível fazer uma correção no valor de V_{max} pela equação (4.39), de modo a prever qual seria seu valor se tivesse sido adicionada menor quantidade de extrato.

$$(V_{max})_{extrato}^{prevista} = (V_{max})_{extrato}^{obtida} \cdot \left(\frac{\text{atividade da bromelina pura}}{\text{atividade do extrato}} \right) \text{ calculadas a partir dos ensaios para determinação da cinética} \quad (4.39)$$

Para a previsão de K_m foram empregadas as equações da correlação linear encontradas nos gráficos de $\frac{1}{v}$ em função de $\frac{1}{C_S}$, uma vez que a menor quantidade de extrato deve refletir no valor do coeficiente linear, com o coeficiente angular permanecendo o mesmo.

A comparação entre os valores de V_{max} e K_m previstos para o extrato, com os valores obtidos para a bromelina pura, (Tabelas 4.46 e 4.47), mostra que o extrato apresenta maiores valores nas duas relações enzima / substrato.

Tabela 4.46 – Valores previstos de V_{max} e K_m para o extrato.

Extrato: relação enzima / substrato	Ensaio	V_{max} prevista extrato $\left(\frac{mmol \text{ tirosina}}{L \text{ min}} \right)$	K_m previsto extrato $\left(\frac{mmol \text{ caseína}}{L} \right)$
base 1 / 25	1°	1,3883	0,2624
	2°	2,6340	0,5392
base 1 / 50	1°	0,4204	0,0785
	2°	0,6426	0,1220
	3°	0,4922	0,1237

Tabela 4.47 – Valores de V_{max} e K_m para a bromelina pura.

Bromelina: relação enzima / substrato	Ensaio	V_{max} $\left(\frac{mmol \text{ tirosina}}{L \text{ min}} \right)$	K_m $\left(\frac{mmol \text{ caseína}}{L} \right)$
1 / 25	1°	1,1606	0,1365
	2°	1,0138	0,1221
	3°	1,0513	0,1106
1 / 50	1°	0,3447	0,0185
	2°	0,3632	0,0238
	3°	0,3321	0,0153

Foi discutido, no item 2.2, que velocidade máxima da reação de hidrólise é atingida se toda a enzima presente estiver formando complexo intermediário com o substrato (equação 2.13), e que a constante K_m corresponde à relação das constantes de velocidade envolvidas (equação 2.12):

$$V_{max} = k_3 C_{Et} \quad (2.13)$$

$$\frac{k_2 + k_3}{k_1} = \frac{C_E C_S}{C_{ES}} = K_m \quad (2.12)$$

Como V_{max} e K_m foram maiores para o extrato, as equações (2.13) e (2.12) indicam que a constante de velocidade k_3 , que corresponde à decomposição do complexo intermediário ES em produtos e restituindo a enzima (equação 2.3), é maior para o extrato em comparação com a bromelina pura.



5 Conclusões

As seguintes conclusões podem ser elaboradas com relação ao planejamento experimental, estabilidade térmica e à cinética da hidrólise enzimática.

5.1 Conclusões com referência aos planejamentos experimentais

Os planejamentos experimentais, aplicados tanto para a bromelina pura quanto para o extrato, nas três relações enzima / substrato estudadas, mostrou ser uma importante técnica para correlacionar a atividade com a temperatura e o pH. Os coeficientes de determinação do modelo (R^2), bem como os gráficos comparativos entre a resposta do modelo e os resultados experimentais, mostraram que as equações quadráticas que definem a atividade em função do pH e da temperatura são satisfatórias.

A derivação das equações quadráticas com relação ao pH, para temperatura constante, permitiu saber qual pH deve ser empregado, a dada temperatura, para se obter a maior atividade. Os ensaios relativos à estabilidade térmica e à cinética enzimática foram efetuados com o pH calculado desta forma, de modo a obter condições de máxima atividade.

A substituição da equação que define o pH para maior atividade, a dada temperatura, na equação do modelo quadrático, resultou na equação que fornece a maior atividade em função da temperatura. Os gráficos da maior atividade em função da temperatura, elaborados para cada relação enzima / substrato, permitiram fazer a comparação entre a bromelina pura e o extrato da casca e do talo do abacaxi. Esta comparação mostrou que os comportamentos da bromelina pura e da bromelina presente no extrato são semelhantes.

Para a relação 1 enzima / 25 substrato, tanto a bromelina pura como o extrato apresentam taxa decrescente de aumento da atividade com a temperatura, o que não foi verificado para as outras relações estudadas. Este fenômeno atribui-

se à maior quantidade de enzima livre na relação 1 / 25 que, por não estar formando complexo intermediário com o substrato, fica mais sujeita a desativação térmica.

A quantidade de extrato empregada para reproduzir a atividade enzimática da bromelina pura, leva à estimativa de 1 a 2 gramas de bromelina por quilograma de fruto, coincidindo com informação encontrada na literatura.

5.2 Conclusões quanto à estabilidade térmica

O procedimento adotado para estudar a estabilidade térmica tanto da bromelina pura como do extrato, nos valores de pH previstos pelo planejamento e em valores menores, mostraram-se satisfatórios, apresentando resultados compatíveis com os encontrados na literatura.

A decomposição térmica mostrou obedecer ao modelo de ordem um, concordando com o observado na literatura. Uma exceção é feita para a bromelina pura a 62 °C, para a qual o modelo de ordem dois foi mais adequado. A equação de Arrhenius representou bem a dependência da constante de inativação com a temperatura.

Verifica-se, tanto para a bromelina pura quanto para o extrato, inativação mais acentuada para o pH entre 3,3 e 3,5 em comparação com valores de pH mais elevados. No pH entre 3,3 e 3,5 a enzima contida no extrato perde atividade mais rapidamente que a bromelina pura devido ao valor de k_0 ser $2,4607 \times 10^{32}$ vezes maior para a enzima do extrato. Devido ao pH ácido, os íons H^+ podem estar contribuindo com uma ação catalítica na inativação da enzima por mecanismo de hidrólise.

Para um processo de obtenção da bromelina a partir da casca e do talo do abacaxi é recomendável trabalhar com os valores de pH para maior atividade, calculados pelas equações obtidas no planejamento experimental.

5.3 Conclusões quanto à cinética da hidrólise enzimática

O modelo de Michaelis - Menten mostrou ser adequado para descrever a cinética com que a caseína é hidrolisada pela ação tanto da bromelina pura, como da bromelina contida no extrato. Portanto, a enzima contida no extrato da casca e do talo do abacaxi estudado (variedade pérola) apresenta o mesmo comportamento verificado para a bromelina proveniente de outras fontes, conforme consta na literatura.

A constante de velocidade que corresponde à decomposição do complexo intermediário enzima - substrato (ES) em produtos, é maior para o extrato em comparação com a bromelina pura.

Em síntese, os resultados encontrados neste trabalho mostram que a bromelina presente nos resíduos (casca e talo) do *ananas comosus* L. Merrill (variedade pérola) tem o mesmo comportamento da bromelina originária do *ananas comosus* de outras fontes. Desta forma, é possível seu emprego nas diversas áreas envolvendo indústria de alimentos, medicina e nutrição animal.

6 Sugestões para trabalhos futuros

Quanto ao planejamento experimental, sugere-se fazer um estudo modificando a temperatura do ponto central para valores maiores do que 35 °C (por exemplo, 45 °C ou 50 °C). Esta alteração permitirá verificar o valor do pH para atividade ótima a temperaturas maiores que 49 °C (limite superior do planejamento efetuado). Permitirá também verificar a tendência de queda da atividade enzimática com a temperatura, para as relações enzima / substrato de 1 / 50 e 1 / 125. Alternativamente, o planejamento poderá ser feito com os limites superior e inferior ampliados, por exemplo, de 10 °C para 20 °C com relação ao ponto central.

Quanto à estabilidade térmica referente ao pH entre 3,3 e 3,5 o estudo poderá ser detalhado empregando intervalos de tempo menores do que 20 minutos, por exemplo, intervalos de 5 minutos. Este detalhamento tem maior interesse para temperaturas acima de 50 °C, que é a situação de inativação térmica mais acentuada.

Com relação à cinética da hidrólise enzimática, para a relação 1 enzima / 125 substrato sugere-se que a concentração do substrato seja maior: por exemplo, o dobro da utilizada no presente trabalho. A concentração máxima no meio reacional seria de 26,6666 g / L. e a mínima de 13,3333 g / L. Assim, a formação de produtos detectáveis a 280 nm seria maior, permitindo leitura de absorbância mais precisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBAN, S.; FRANZ, M. E.; FRANZ, G. Influence of the therapeutically used enzymes bromelain, papain, and trypsin on the blood coagulation in vitro. **Pharm. Pharmacol. Lett.** v. 7(2/3), p. 59-62, 1997./ Resumo 127:243058 no Chemical Abstracts/
- APINUNJARUPONG, S.; LAPNIRUN, S.; THEERAKULKAIT, C. Preparation and some functional properties of rice bran protein concentrate at different degree of hydrolysis using bromelain and alkaline extraction. **Preparative biochemistry & biotechnology**. v. 39(2), p 183-193, 2009. / Resumo na base de dados *Scopus* - Portal de Periódicos da CAPES/
- ARROYO-REYNA, A.;HERNANDEZ-ARANA, A.; ARREGUIN-ESPINOSA, R. Circular dichroism of stem bromelain: a third spectral class within the family of cysteine proteinases. **Biochem. J.** v. 300(1), p. 107-110, 1994. / Resumo 121:3898 no Chemical Abstracts/
- ARROYO-REYNA, A.; HERNANDEZ –ARANA, A. The thermal denaturation of stem bromelain is consistent with an irreversible two-state model. **Biochim.Biophys. Acta**,1248(2), 123-8, 1995.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos – Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas. Editora da UNICAMP, 2002, 481p.
- BENDER et al. The correlation of the pH (pD) dependence and the stepwise mechanism of a-chymotrypsin-catalyzed reactions. **Journal of American Chemical Society**. v. 86, p. 3680-3690, 1964.
- BLOEMBERGEN, P. et al. Endotoxin-induced auto-immunity in mice. I. Time and dose dependence of production and serum levels of antibodies against bromelain-treated mouse erythrocytes and circulating immune complexes. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.** v. 84(3), p. 291-7, 1987.
- BOWELL, P.J.; CULLY, B.J.; YOUNG, N.T. Bromelain solutions for use in automated anti-D quantitation: a potential hazard. **Med. Lab. Sci.** v. 45(2), p. 146-50, 1988. / Resumo 109:21256 no Chemical Abstracts/
- BRAKEBUSCH, M. et al Bromelain is an accelerator of phagocytosis, respiratory burst and killing of *Candida albicans* by human granulocytes and monocytes. **European Journal of Medical Research**. v. 6(5), p.193-200, 2001./ Resumo 136:149545 no Chemical Abstracts/
- CESAR, A.C.W. **Análise de viabilidade econômica de um processo de extração e purificação da bromelina do abacaxi**. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2005, p. 60-63. Tese (Doutorado).
- CHEN, L.H. et al. Immobilization of pronase, stem bromelain, and trypsin on crab

- chitosan. **Chung-kuo Nung Yeh Hua Hsueh Hui Chih.** v. 26(1), p. 1-9, 1988./ Resumo 109:88856 no Chemical Abstracts/
- CHEN, Q. et al. Kinetic studies of denaturation and inactivation of stem bromelain by urea. **Xiamen Daxue Xuebao, Ziran Kexueban.** v. 30(2), p. 204-8, 1991. / Resumo 117:65364 no Chemical Abstracts/
- CHEN, Q. et al. Kinetic studies of inactivation and denaturation of fruit bromelain in organic solvents. **Xiamen Daxue Xuebao, Ziran Kexueban.** v. 32(1), p. 88-93, 1993. / Resumo 121:151924 no Chemical Abstracts/
- CHOI, C. et al. Purification and characteristics of bromelain from Korean pineapple. **Han'guk Nonghwa Hakhoechi,** v. 35(1), p. 23-9, 1992./ Resumo 117:46934 no Chemical Abstracts/
- CORTECS UK LTD. MYNOTT, T.L.; ENGWERDA, C.; PEEK, K. **Protein CCX2 component of bromelain with biological activity.** WO 9838320, 1998a./ Resumo 129:213521 no Chemical Abstracts/
- CORTECS UK LTD. MYNOTT, T.L.; ENGWERDA, C.; PEEK, K. **Fractionation and pharmacological activities of bromelain components.** WO 9838291, 1998b./ Resumo 129:199800 no Chemical Abstracts/
- DAMASCENO, L. H. S. et al. Effect of mixing mode on the behavior of an ASBBR with immobilized biomass in the treatment of cheese whey. **Brazilian Journal of Chemical Engineering,** v.25, p. 291-298, 2008.
- DAUD, W.R.B.W.; YUSOF, M.F.B.; RAO, D.S.K. Process of preparing bromelain from pineapple stem juice. **Pertanika,** v. 13(1), p. 113-21, 1990. / Resumo 114:97133 no Chemical Abstracts/
- DEVAKATE, R.V. et al. Purification and drying of bromelain. **Separation and Purification Technology.** v. 64(3), p. 259-264, 2009. / Resumo na base de dados *Scopus* - Portal de Periódicos da CAPES/
- FISCHER, G.A. **Estudo e modelagem do processo de extração da bromelina por micelas reversas em uma coluna de campânulas pulsantes.** Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2006, p. 45-49. Tese (Doutorado).
- FOGLER, H.S. **Elementos de Engenharia das Reações Químicas.** 3.ed. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Editora S.A., 2002, p. 346-351.
- FOUNDATION FOR SCIENTIFIC TECHNOLOGY PROMOTION. WATANABE, M. **Control of allergens in flour by adding proteinases.** JP 09172995, Heisei, p.8, 1997. / Resumo 127:160995 no Chemical Abstracts/
- FREIMAN DE OLIVEIRA, L. Advantages of bromelain use in food processing and medicine. **Alimentos e Nutrição,** v. 12, p. 215-226, 2001./ Resumo 137:383915 no Chemical Abstracts/

- FREIMAN, L. O.; SABAA SRUR, A.U.O. Use of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill) agroindustrial residues for the production of bromelain. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.16(3), p. 246-249, 1996.
- FREIMAN, L. O.; SABAA SRUR, A.U.O. Determination of total protein and amino acid composition of bromelains extracted from pineapple plant residues (*Ananas comosus*, (L.) Merrill). **Cienc. Tecnol. Aliment.**, v. 19(2), p. 170-173, 1999.
- GARBIN, F. et al. Bromelain proteinase F9 augments human lymphocyte-mediated growth inhibition of various tumor cells in vitro. **Int. J. Oncol.** v. 5(2), p. 197-203, 1994./ Resumo 121:271436 no Chemical Abstracts/
- GIL, H. et al. Mechanistic studies of nonenzymic glycation of protein on reactivity in proteolysis and inhibition. In **Conf. Latinoam. Fis.-Quim.Org.**, 3rd, p. 607-624, 1995. / Resumo 127:315953 no Chemical Abstracts/
- GIL, H. et al Functional consequences and spectroscopic changes in native, inhibited, and nonenzymically glycated proteins. **Inf. Tecnol.**, v. 8(3), p. 31-42, 1997./ Resumo 127:146278 no Chemical Abstracts/
- GODOI, P.H. **Estudo da atividade enzimática da bromelina pura em solução, em diferentes temperaturas e pH.** Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007, p. 39. Dissertação Mestrado.
- GUPTA, P.; MAQBOOL, T.; SALEEMUDDIN, M. Oriented immobilization of stem bromelain via de lone histidine on a metal affinity support. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.** v. 45(3-4), p. 78-83, 2007. / Resumo na base de dados *Scopus* - Portal de Periódicos da CAPES/
- GUPTA, P.; SALEEMUDDIN, M. Bioaffinity based oriented immobilization of stem bromelain. **Biotechnology Letters.** v. 28 (12), p. 917-922, 2006. / Resumo na base de dados *Scopus* - Portal de Periódicos da CAPES/
- HALE, L.P. et al. Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations. **International Immunopharmacology.** v. 5(4), p. 783-793, 2005./ Resumo 142:423349 no Chemical Abstracts/
- HARRACH, T. et al Bromelain proteinases modulate the CD44 expression on human Molt 4/8 leukemia and SK-Mel 28 melanoma cells in vitro. **Int. J. Oncol.**, v. 5(3), p. 485-8, 1994./ Resumo 121:221310 no Chemical Abstracts/
- HARRACH, T. et al. Isolation and partial characterization of basic proteinases from stem bromelain. **Journal of Protein Chemistry**, v. 14(1), p. 41-52, 1995.
- HARRACH, T. et al. Isolation and characterization of two forms of an acidic bromelain stem proteinase. **J. Protein Chem.** v. 17(4), p. 351-361, 1998.
- HATANO, K-I; SAWANO, Y.; TANOKURA, M. Structure-funtion relationship of bromelain isoinhibitors from pineapple stem. **Biological Chemistry**, v. 383(7/8), p. 1151-1156, 2002. / Resumo 138:283085 no Chemical Abstracts/

- HATANO, K-I; TANOKURA, M.; TAKAHASHI, K. The amino acid sequences of isoforms of the bromelain inhibitor from pineapple stem. **J. Biochem.**, v. 124(2), p. 457-461, 1998.
- HAYASHI, T. et al. Enzymic hydrolysis of water-soluble random copolypeptides. **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 43(12),p. 2223-30, 1991.
- HAYASHI, T.; IKADA, Y. Protease immobilization onto porous chitosan beads. **J. Appl. Polym. Sci.** v. 42(1), p. 85-92, 1991.
- HAYASHI, T. et al. Immobilization of thiol proteases onto porous poly (vinyl alcohol) beads. **Polym. J.** v. 25(5), p. 489-97,1993. / Resumo 119:90092 no Chemical Abstracts/
- HAYASHI, T. et al Enzymatic hydrolysis of random copolypeptides consisting of N-hydroxypropyl-L-glutamine and L-leucine. **European Polymer Journal**, v. 37(12), p. 2483-2489, 2001.
- HEMAVATHI, A.B.; HEBBAR, H.U.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Reverse micellar extraction of bromelain from Ananas Comosus L. Merryl. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology.** v. 82(11), p. 985-992, 2007. / Resumo na base de dados *Scopus* - Portal de Periódicos da CAPES/
- HUANG, Z.; LIN, S.; LI, M. An improvement to the producing technology of fruit Bromelain. **Zhiwu Ziyuan Yu Huanjing**, v. 2(1), p. 25-30, 1993. / Resumo 120:26019 no Chemical Abstracts/
- HUNG, T-H. et al. Purification and characterization of hydrolase with chitinase and chitosanase activity from commercial stem bromelain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v. 50(16), p.4666-4673, 2002.
- INOUE, K.; NAGAI, K. A novel and convenient assay method for proteinase activity by measuring turbidity change in proteolytic digestion of soy protein isolates. **Daizu Tanpakushitsu Kenkyu.** v. 7, p.48-51, 2004./ Resumo 142:235285 no Chemical Abstracts/
- JACQUELINE, G. et al Hydrolysis of casein: a comparative study of two proteases and their peptide maps. **Int. J. Food Sci. Technol.**, 29(3), 279-85, 1994.
- JASIM, M. A. et al. A comparison of immobilized protease activities. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** v. 40(4), p. 251-8, 1987. / Resumo 108:108828 no Chemical Abstracts/
- JOUBERT, F.J.; TALJAARD, N.; CLARK, R.C. Sulfhydryl protease inhibitors from pineapple plant stem. **Int. J. Biochem.**, v. 22(12), p. 1401-6, 1990.
- KAMATA, Y. et al. Selection of commercial enzymes for soybean curd production by limited proteolysis with immobilized enzyme reactor. **Shokuhin Kogyo Gakkaishi.** v. 39(1), p. 102-5, 1992. / Resumo 117:149769 no Chemical Abstracts/

- KATS, M.; St GERMAIN, M. E., Spectroscopic determination of protein concentrations from proteinase K digests. **Analytical Biochemistry**, v. 307, p. 212-218, 2002.
- 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(6), p.709-714, 2003.
- KIM, H.J.; TAUB, I.A.; Specific degradation of myosin in meat by bromelain. **Food Chem**, v. 40(3), p. 337-43, 1991.
- KLEEF, R.; DELOHERY, T.M.; BOVBJERG, D.H. Selective modulation of cell adhesion molecules on lymphocytes by bromelain protease 5. **Pathobiology**, v. 64(6), p. 339-346, 1997.
- KO, B-S; HWANG, Y-I; LEE, S-C. Simple purification of bromelain from pineapple. **J. Food Sci. Nutr.** , v. 1(1), p. 106-110, 1996. / Resumo 127:80482 no Chemical Abstracts/
- 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 Kwahakpyon**. v. 31, p. 137-42, 1990./ Resumo 115:67267 no Chemical Abstracts/
- LEE, K.L. et al. Complete amino acid sequence of ananain and a comparison with stem bromelain and other plant cysteine proteases. **Biochem. J.**, v. 327(1), p. 199-202, 1997.
- LI, X.; LIN, Z. Effect of carboxyl Ca^{2+} , and Zn^{2+} on bromelain thermal stability. **Yaowu Shengwu Jishu**. v. 8(6), p. 339-341, 2001./ Resumo 137:2342 no Chemical Abstracts/
- LIANG, H.H.; HUANG, H.H.; KWOK, K.C. Properties of tea-polyphenol-complexed bromelain. **Food Res. Int.**, v. 32(8), p. 545-551, 2000.
- LOTZ-WINTER, H., On the pharmacology of bromelain: an update with special regard to animal studies on dose-dependent effects. **Planta Med.**, v. 56(3), p. 249-53,1990.
- MAURER, H.R. et al; Bromelain induces the differentiation of leukemic cells in vitro: an explanation for its cytostatic effects? **Planta Med.**, v. 54(5), p. 377-81, 1988.
- MAURER, H.R. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58(9), p. 1234-1245, 2001.
- MIYACHI, Y. et al. Biodegradation of copoly (N-hydroxyethyl-D, L-glutamine) *in vitro*. **Eur. Polym. J.** v. 35(4), 607-612, 1999.
- MOCKAITIS, G. et al. Anaerobic whey treatment by a stirred sequencing batch

- reactor (ASBR): effects of organic loading and supplemented alkalinity. **Journal of Environmental Management**. v. 79, 198-206, 2006.
- MOREIRA, A.S.; SILVA, D.N.; CHIAVONE FILHO, O. Aqueous two-phase equilibrium data for polyethylene glycol, potassium phosphate and bromelain. In: **INTERNATIONAL SOLVENT EXTRACTION CONFERENCE**, Conference, Cape Town, South Africa, p. 174-179, 2002. / Resumo 137:84216 no Chemical Abstracts/
- MORRISON, R.; BOYD, R. **Química Orgânica**. 8. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1983, p. 1327-8.
- MUCOS PHARMA G.M.B.H. UND CO; STAUDER, G.; RANSBERGER, K.; **Use of at least a hydrolytic enzyme and a flavonoid for treatment of illnesses caused by hepatitis C virus**. DE 19804742 , 1999. / Resumo 131:125445 no Chemical Abstracts/
- MURATA, K. et al. Studies on coagulation of soy milk protein by commercial proteinases. **Agric. Biol. Chem.**, v. 51(2), p. 385-9, 1987.
- MYNOTT T.,L. et al; Protein CCX2 component of bromelain with biological activity. GB 97-3850 25 Feb 1997.
- OGASWARA, K.; MAZDA, T. Differences in substrate specificities for cysteine proteinases used in blood group serology, and the use of bromelain in two-phase inhibitor technique. **Vox Sang**. v. 57(1), p. 72-6, 1989.
- OHMORI, T.; YANG, R.Y.K. Self-sustained pH oscillations in immobilized proteolytic enzyme systems. **Biophys. Chem**. v. 59, p. 87-94, 1996.
- ORSINI, R.A. Bromelain. **Plastic and Reconstructive Surgery**. v. 118(7), p. 1640-1644, 2006. / Resumo na base de dados *Scopus* - Portal de Periódicos da CAPES/
- ORTIZ, S. E. M.; ANON, M.C. Analysis of products, mechanisms of reaction, and some functional properties of soy protein hydrolysates. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 77(12), p. 1293-1301, 2000.
- QUATTRUCCI, E. et el; Protein digestibility and organoleptic evaluation of enzymically treated milk. **Riv. Soc. Ital. Sci. Aliment.**, v. 20(4), p. 209-15, 1991. / Resumo 116:19955 no Chemical Abstracts/.
- RASHEEDI, S.; HAQ, S.K.; KHAN, R.H. Guanidine hydrochloride denaturation of glycosylated and deglycosylated stem bromelain. **Biochemistry**. v.68(10), p. 1097-1100, 2003.
- RAWEL, H.M. et el; Physicochemical and Enzymic Properties of Benzyl Isothiocyanate Derivatized Proteinases. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46(12), p. 5043-5051, 1998.

- RAWEL, H.M.; KROLL, J.; SCHROEDER, I. Reactions of isothiocyanates with food proteins. Influence on enzyme activity and tryptic degradation. **Nahrung**, v. 42(3-4), p. 197-199, 1998.
- RETROSCREEN LTD.; SUTTON, P.M.; OXFORD, J.S.; **Protease for the treatment of viral infections and sterilization of pharmaceutical and food products**. EP 358500, 1990./ Resumo 113:165408 no Chemical Abstracts/
- RITONJA, A. et al. Stem bromelain: amino acid sequence and implications for weak binding of cystatin. **Febs Lett.**, v. 247(2), p. 419-24, 1989.
- RODRIGUES, J. A. D. et al. Influence of agitation rate on the performance of an anaerobic sequencing batch reactor containing granulated biomass treating low-strength wastewater **Advances in environmental research**. v.7, p. 405-410, 2003.
- RODRIGUES, J. A. D. et al. Enhancement of the performance of an anaerobic sequencing batch reactor treating low-strength wastewater through implementation of a variable stirring rate program. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v.21, p. 423-434, 2004.
- ROXAS, M. The role of enzyme supplementation in digestive disorders. **Alternative Medicine Review**. v. 13(4), p. 307-314, 2008. / Resumo na base de dados *Scopus* - Portal de Periódicos da CAPES/
- ROWAN, A.D.; BUTTLE, D.J.; BARRETT, A.J. Ananain: a novel cysteine proteinase found in pineapple stem. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 267(1), p. 262-70, 1988.
- ROWAN, A.D.; BUTTLE, D.J.; BARRETT, A.J. The cysteine proteinases of the pineapple plant. **Biochem. J.**, v. 266(3), p. 869-75, 1990. / Resumo 112:194237 no Chemical Abstracts/.
- ROWAN, A.D. Fruit bromelain. **Handbook of Proteolytic Enzymes** (2nd Edition), v. 2, p. 1137-1138, Elsevier, 2004a. / Resumo 142:293349 no Chemical Abstracts/
- ROWAN, A.D. Stem bromelain. **Handbook of Proteolytic Enzymes** (2nd Edition), v. 2, p. 1136-1137, Elsevier, 2004b. / Resumo 142:293348 no Chemical Abstracts/.
- ROWAN, A.D. Ananain. **Handbook of Proteolytic Enzymes** (2nd Edition), v. 2, p. 1139-1140, Elsevier, 2004c. / Resumo 142:311839 no Chemical Abstracts/.
- SCOTT, M.L.; JOHNSON, C.A.; PHILLIPS, P.K. The pH optima for papain and bromelain treatment of red cells. **Vox Sang.**, v. 52(3), p. 223-7, 1987.
- SECOR Jr, E.R. et al. Bromelain treatment reduces CD 25 expression on activated CD 44+ T cells in vitro. **International Immunopharmacology**, v. 9(3), p. 340-346, 2009. / Resumo na base de dados *Scopus* - Portal de Periódicos da CAPES/

- SEGEL, I.H. **Enzyme Kinetics – Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems**. New York: John Wiley & Sons Inc.1993, p. 18-28.
- SEGUCHI, M.; HAYASHI, M.; MATSUMOTO, H. Effect of a wheat protein on pH-dependent water-binding capacity and viscosity of wheat tailings fractions. **Cereal Chem.**, v. 74(4), p. 384-388, 1997.
- SEO, H. et al. Spacer effects on enzymic activity of bromelain immobilized onto porous chitosan beads. **Eur. Polym. J.** v. 34(7), p. 917-922, 1998.
- SINGH, L.R.; DEVI, T. P.; DEVI, S. K. Purification and characterization of a pineapple crown leaf thiol protease. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 34(1), p. 25-43, 2004. / Resumo 140:402175 no Chemical Abstracts/
- SMITH, J.M.; **Chemical Engineering Kinetics**.2.ed. Tokyo: McGraw-Hill Kogakusha Ltd. 1970, p. 44-46.
- SRIWATANAPONGSE, A.; BALABAN, M.; TEIXEIRA, A. Thermal inactivation kinetics of bromelain in pineapple juice. **Transactions of the ASAE**, v. 43(6), p. 1703-1708, 2000.
- SUH, H.J. et al. Purification and characterization of bromelain isolated from pineapple. **Han'guk Nonghwa Hakhoechi**. v. 35(4), p. 300-7, 1992. / Resumo 118:2771 no Chemical Abstracts/
- TAHA, F.S.; IBRAHIM, M.A. Effect of degree of hydrolysis on the functional properties of some oilseed proteins. **Grasas y Aceites**. v. 53(3), p. 273-281, 2002./ Resumo 138:384346 no Chemical Abstracts/
- TAHA, F.S.; IBRAHIM, M.A.; EL-ZANATY, E.A. Optimum conditions for enzymatic degradation of some oilseed proteins. **Grasas y Aceites**, v. 53(3), p. 267-272, 2002. / Resumo 138:367774 no Chemical Abstracts/
- TAHA, F.S.; IBRAHIM, M.A.; ISMAIL, A. Effect of partial enzymatic hydrolysis on the molecular weight of some oilseed protein. **Egyptian Journal of Food Science**, v. 30(2), p. 247-268, 2002. / Resumo 139:349821 no Chemical Abstracts/
- TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD, WAKO PURE CHEM IND LTD SHUKUDA, Y; NAKAJIMA, K. Stabilization of the bromelain solution with mercury for blood analysis. JP 08098688, Heisei, p.5, 1991./ Resumo 125:29130 no Chemical Abstracts/
- TAUSSIG, S.J.; BATKIN, S. Bromelain, the enzyme complex of pineapple (*Ananas comosus*) and its clinical application. An update. **J. Ethnopharmacol.**, v. 22(2), p. 191-203, 1988.
- TECHNOBLE K. K. JAPAN; YAMADA, K.; NAITO, K.; SAWAKI, S. Cosmetics

- containing rice starch hydrolyzates. JP 09169616, Heisei p. 19, 1997. / Resumo 127:166538 no Chemical Abstracts/
- THEODOROU, L.G.; BIETH, J.G.; PAPAMICHAEL, E.M. The catalytic mode of cysteine proteinases of papain (C1) family. **Bioresource Technology**. v. 98(10) p. 1931-1939, 2007. / Resumo na base de dados *Scopus* - Portal de Periódicos da CAPES/
- TISSEAU, R. Use of pineapple canning waste. Feasibility of bromelain extraction. **Fruits**, v. 41(12), p. 703-8, 1986./ Resumo 106:219081 no Chemical Abstracts/
- TOMANKOVA, O.; KOPECNY, J. Prediction of feed protein degradation in the rumen with bromelain. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v. 53(1), p. 71-80, 1995./ Resumo 123:82179 no Chemical Abstracts/
- TOPHAM, C.M. et al. Investigation of mechanistic consequences of natural structural variation within the cysteine proteinases by knowledge-based modeling and kinetic methods. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 18(4), p. 579-80, 1990.
- TURK, B.; TURK, V.; TURK, D. Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. **Biol. Chem.**, v. 378, p. 141-150, 1997.
- UMESH, H.H.; SUMANA, B.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Use of reverse micellar systems for the extraction and purification of bromelain from pineapple wastes. **Bioresource Technology**, v. 99(11), p. 4896-4902, 2008. / Resumo na base de dados *Scopus* - Portal de Periódicos da CAPES/
- USSR ACADEMY OF SCIENCES, IEVLEVA, E.V. et al. **Method of preparing bromelain**. USSR SU 1804855, *Izobreteniya* v. 12, p. 17, 1993. / Resumo 121:33775 no Chemical Abstracts/
- UYAMA SHIZUO; UDA H.; UYAMA, S. Deodorants for treating odorous gases from biological wastes. JP 03173564, **Heisei**, p. 3, 1991. / Resumo 115:189026 no Chemical Abstracts/
- WALSTRA, P. et al. **Dairy Technology – Principles of Milk Properties and Processes**. New York: Marcel Dekker Inc., 1999, p. 81.
- WHITAKER J.R. **Principles of enzymology for the food sciences**. New York: Marcel Dekker Inc., 1972, p. 182.
- WHITE, R.R. et al; Bioavailability of 125I-bromelain after oral administration to rats. **Biopharm. Drug Dispos.**, v. 9(4), p. 397-403, 1988./ Resumo 109:85710 no Chemical Abstracts/
- YASUYOSHI, M. et al; Biodegradation of copoly (N-hydroxyethyl-D, L-glutamine) in vitro. **European Polymer Journal**, 35(4), 607-612, 1999.

YODOYA, S. et al. Immobilization of bromelain onto porous copoly (γ -methyl-L-glutamate / L-leucine) beads. **European Polymer Journal**. v. 39(1), p. 173-180, 2003.

APÊNDICE I

Reagentes utilizados

Reagente.	Fornecedor	Lote
Bromelina liofilizada 16990	Fluka and Riedel Haën	444431 / 1
Caseína pura C1014.06.AG	Labsynth	78689 e 105320
Hidróxido de sódio (perolizado)	Vetec	0501420
Ácido clorídrico (37 %)	Vetec	0506099
Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4)	Nuclear	96020271
Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4)	Vetec	042005
Ácido tricloroacético - TCA (A1066.01.AG)	Labsynth	102947
Tirosina (L-tirosina PA T1018.01.AD)	Labsynth	100547

APÊNDICE II

Preparo com os reagentes auxiliares

Preparo da solução tampão:

- Dissolver 34,00 gramas de KH_2PO_4 em água desmineralizada e avolumar para 250 mililitros.
- Dissolver 43,50 gramas de K_2HPO_4 em água desmineralizada e avolumar para 250 mililitros.
- Misturar as duas soluções obtendo-se assim 500 mililitros da solução tampão.

Preparo da solução de TCA 0,3 molar:

- Dissolver 49,05 gramas de TCA e avolumar para 1000 mililitros.

Preparo das soluções de tirosina (a solubilização da tirosina mostrou-se mais rápida quando efetuada em meio levemente ácido):

- Dissolver 0,453 gramas de tirosina e avolumar para 500 mililitros empregando uma solução 0,05 molar de ácido clorídrico (HCl), obtendo-se uma solução mãe 5,0000 milimolar.
- Partindo da solução mãe, fazer diluições de modo a obter soluções 0,1250; 0,3125; 0,6250; 1,0000; 1,2500; 1,40625; 1,8750; 2,0000 e 2,5000 milimolar.

APÊNDICE III

Tabela 4.1 – Primeiro conjunto de ensaios para calibração do espectrofotômetro.

Tirosina ($\frac{mmol}{litro}$)	Absorbância (α)				Tirosina ($\frac{mmol}{litro}$)	Absorbância (α)			
	leitura	média	desvio	variação (%)		leitura	média	desvio	variação (%)
0,1250	0,1990	0,2025	0,0141	6,963	1,4658	1,2500	1,4682	0,0161	1,097
	0,2135				1,4835				
	0,2054				1,4760				
	0,2223				1,4852				
	0,1889				1,4519				
	0,1858				1,4471				
0,3125	0,4157	0,4185	0,0126	3,011	1,6209	1,40625	1,6296	0,0139	0,853
	0,4284				1,6432				
	0,4202				1,6431				
	0,4362				1,6399				
	0,4072				1,6151				
	0,4030				1,6153				
0,6250	0,7765	0,7774	0,0128	1,647	2,0583	1,8750	2,0613	0,0153	0,742
	0,7886				2,0812				
	0,7835				2,0723				
	0,7915				2,0681				
	0,7620				2,0453				
	0,7624				2,0428				
1,0000	1,2048	1,1986	0,0149	1,243	2,1520	2,0000	2,1540	0,0219	1,017
	1,2105				2,1897				
	1,2052				2,1615				
	1,2114				2,1578				
	1,1786				2,1352				
	1,1808				2,1277				

APÊNDICE IV

Tabela 4.2 – Conjunto de ensaios complementares para calibração do espectrofotômetro.

Tirosina ($\frac{mmol}{litro}$)	Absorbância (α)				tirosina ($\frac{mmol}{litro}$)	Absorbância (α)			
	leitura	média	desvio	variação (%)		leitura	média	desvio	variação (%)
0,1250	0,1409	0,1466	0,0032	2,183	1,4094	1,2500	1,4233	0,0160	1,124
	0,1485				1,4284				
	0,1490				1,4218				
	0,1453				1,4198				
	0,1465				1,4082				
	0,1494				1,4519				
0,3125	0,3591	0,3658	0,0040	1,093	1,5629	1,40625	1,5823	0,0238	1,504
	0,3685				1,5872				
	0,3649				1,5942				
	0,3666				1,5841				
	0,3650				1,5488				
	0,3708				1,6165				
0,6250	0,7182	0,7272	0,0104	1,430	1,9987	1,8750	2,0151	0,0209	1,037
	0,7291				2,0223				
	0,7278				2,0147				
	0,7253				2,0153				
	0,7169				1,9897				
	0,7458				2,0499				
1,0000	1,1389	1,1489	0,0103	0,897	2,0997	2,0000	2,1095	0,0184	0,872
	1,1510				2,1160				
	1,1487				2,1149				
	1,1485				2,0979				
	1,1392				2,0884				
	1,1672				2,1401				

APÊNDICE V

Tabela 4.6 –Atividade em função das variáveis codificadas (bromelina pura relação 1 / 25)

pH_{cd}	t_{cd}	Atividade A $\left(\frac{mmol \text{ tirosina}}{L \cdot minuto} \right)$
-1	-1	0,2265
1	-1	0,2115
-1	1	0,3806
1	1	0,2830
$-\sqrt{2}$	0	*
$\sqrt{2}$	0	0,2322
0	$-\sqrt{2}$	0,2267
0	$\sqrt{2}$	0,3792
0	0	0,3257
0	0	0,3250
0	0	0,3430
-1	-1	0,2561
1	-1	0,2028
-1	1	0,4348
1	1	0,3005
$-\sqrt{2}$	0	0,2721
$\sqrt{2}$	0	0,2085
0	$-\sqrt{2}$	0,2200
0	$\sqrt{2}$	0,4516
0	0	*
0	0	0,3595
0	0	0,3315

* ensaios perdidos.

APÊNDICE VI

Tabela 4.8 –Atividade em função das variáveis codificadas (bromelina pura relação 1 / 50)

pH_{cd}	t_{cd}	Atividade A $\left(\frac{mmol \text{ tirosina}}{L \cdot minuto} \right)$
-1	-1	0,1001
1	-1	0,0785
-1	1	0,3201
1	1	0,1388
$-\sqrt{2}$	0	0,1850
$\sqrt{2}$	0	0,0793
0	$-\sqrt{2}$	0,0919
0	$\sqrt{2}$	0,2974
0	0	0,1738
0	0	0,1734
0	0	0,1774
-1	-1	0,1001
1	-1	0,0759
-1	1	0,3224
1	1	0,1403
$-\sqrt{2}$	0	0,1844
$\sqrt{2}$	0	0,0825
0	$-\sqrt{2}$	0,0893
0	$\sqrt{2}$	0,2833
0	0	0,1730
0	0	0,1760
0	0	0,1750

APÊNDICE VII

Tabela 4.10 – Atividade em função das variáveis codificadas (bromelina pura: 1 / 125).

pH_{cd}	t_{cd}	Atividade A $\left(\frac{mmol \text{ tirosina}}{L \cdot minuto} \right)$
-1	-1	0,0343
1	-1	0,0317
-1	1	0,1301
1	1	0,1002
$-\sqrt{2}$	0	*
$\sqrt{2}$	0	0,0562
0	$-\sqrt{2}$	0,0277
0	$\sqrt{2}$	0,1516
0	0	0,0747
0	0	0,0765
0	0	0,0754
-1	-1	0,0251
1	-1	0,0273
-1	1	0,1046
1	1	0,0853
$-\sqrt{2}$	0	0,0504
$\sqrt{2}$	0	0,0428
0	$-\sqrt{2}$	0,0208
0	$\sqrt{2}$	0,1313
0	0	0,0628
0	0	0,0641
0	0	0,0605

* ensaio perdido.

APÊNDICE VIII

Tabela 4.12 – Atividade em função das variáveis codificadas (extrato – base relação 1/25)

pH_{cd}	t_{cd}	Atividade A $\left(\frac{mmol \text{ tirosina}}{L \cdot minuto} \right)$
-1	-1	0,2870
1	-1	0,1970
-1	1	0,5297
1	1	0,3482
$-\sqrt{2}$	0	0,3447
$\sqrt{2}$	0	0,2015
0	$-\sqrt{2}$	0,1812
0	$\sqrt{2}$	0,4743
0	0	0,3760
0	0	0,3959
0	0	0,3566
-1	-1	0,2866
1	-1	0,1688
-1	1	0,5041
1	1	0,3549
$-\sqrt{2}$	0	0,4083
$\sqrt{2}$	0	0,1882
0	$-\sqrt{2}$	0,1929
0	$\sqrt{2}$	0,4737
0	0	0,3719
0	0	0,4103
0	0	0,3418

APÊNDICE IX

Tabela 4.14 – Atividade em função das variáveis codificadas (extrato – base relação 1/50)

pH_{cd}	t_{cd}	Atividade A $\left(\frac{mmol \text{ tirosina}}{L.minuto} \right)$
-1	-1	0,1862
1	-1	0,1186
-1	1	0,3956
1	1	0,1998
$-\sqrt{2}$	0	0,2678
$\sqrt{2}$	0	0,1309
0	$-\sqrt{2}$	0,1700
0	$\sqrt{2}$	0,4088
0	0	0,2944
0	0	0,2888
0	0	0,2914
-1	-1	0,1870
1	-1	0,1425
-1	1	0,4073
1	1	0,2043
$-\sqrt{2}$	0	0,2859
$\sqrt{2}$	0	0,1387
0	$-\sqrt{2}$	0,1680
0	$\sqrt{2}$	0,4249
0	0	0,3055
0	0	0,3020
0	0	0,2959

APÊNDICE X

Tabela 4.16 – Atividade em função de variáveis codificadas (extrato – base relação 1/125)

pH_{cd}	t_{cd}	Atividade A $\left(\frac{mmol \text{ tirosina}}{L \cdot minuto} \right)$
-1	-1	0,0256
1	-1	0,0331
-1	1	0,1163
1	1	0,0847
$-\sqrt{2}$	0	0,0607
$\sqrt{2}$	0	0,0428
0	$-\sqrt{2}$	0,0361
0	$\sqrt{2}$	0,1445
0	0	0,0736
0	0	0,0757
0	0	0,0741
-1	-1	0,0273
1	-1	0,0368
-1	1	0,1256
1	1	0,1027
$-\sqrt{2}$	0	0,0558
$\sqrt{2}$	0	0,0489
0	$-\sqrt{2}$	0,0257
0	$\sqrt{2}$	0,1800
0	0	0,0876
0	0	0,0848
0	0	0,0890

APÊNDICE XI

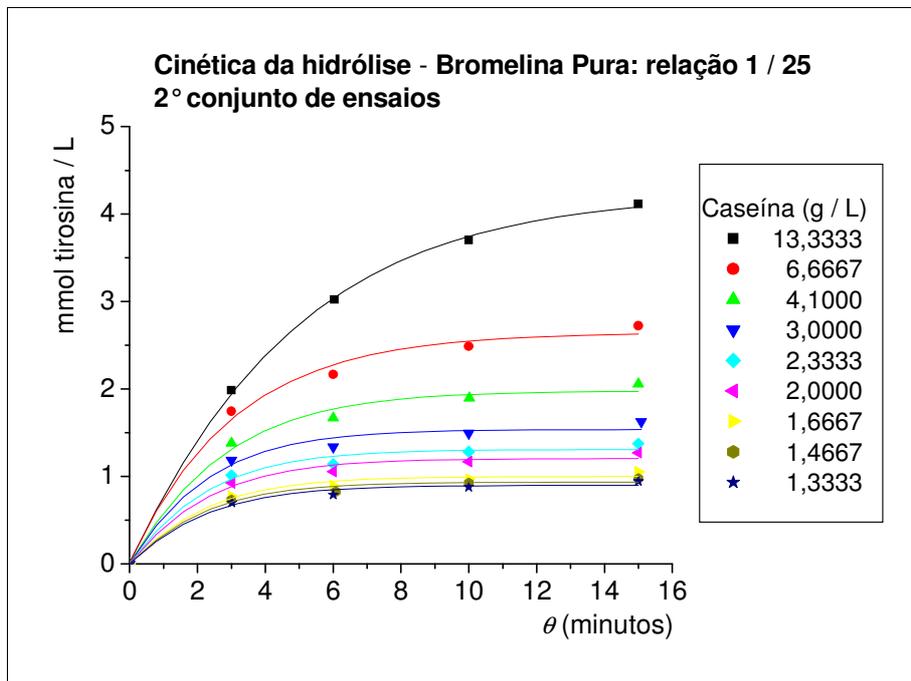


Figura 4.47 – Concentração de tirosina em função do tempo para bromelina pura, relação 1 / 25: 2º conjunto de ensaios.

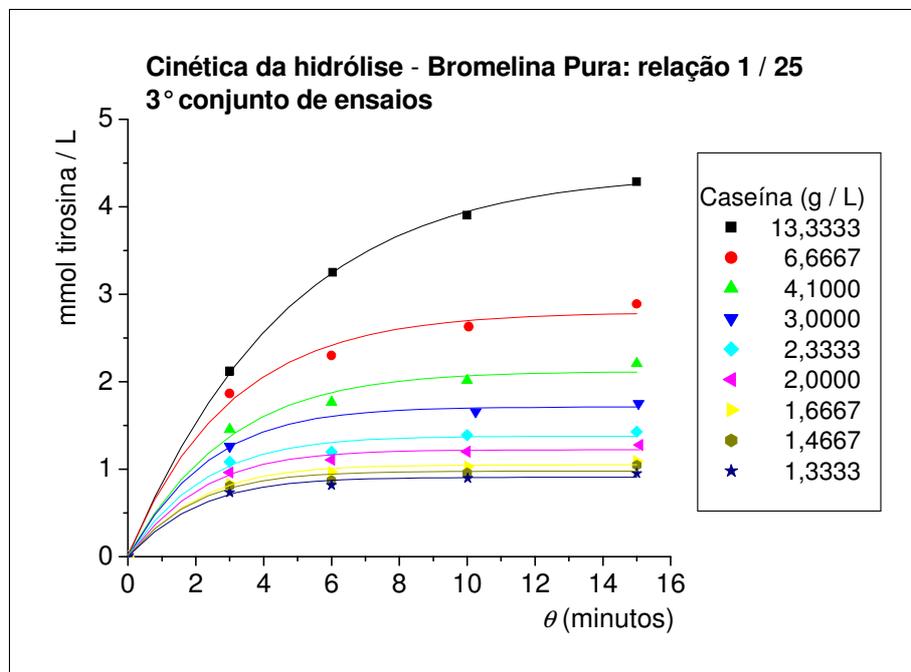


Figura 4.48 – Concentração de tirosina em função do tempo para bromelina pura, relação 1 / 25: 3º conjunto de ensaios.

APÊNDICE XII

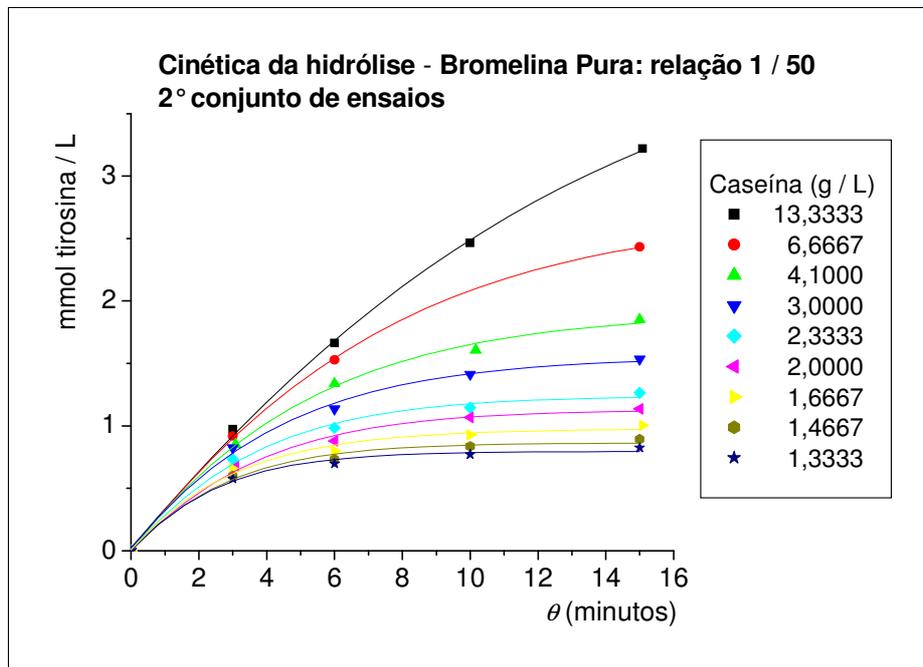


Figura 4.51 – Concentração de tirosina em função do tempo para bromelina pura, relação 1 / 50: 2° conjunto de ensaios.

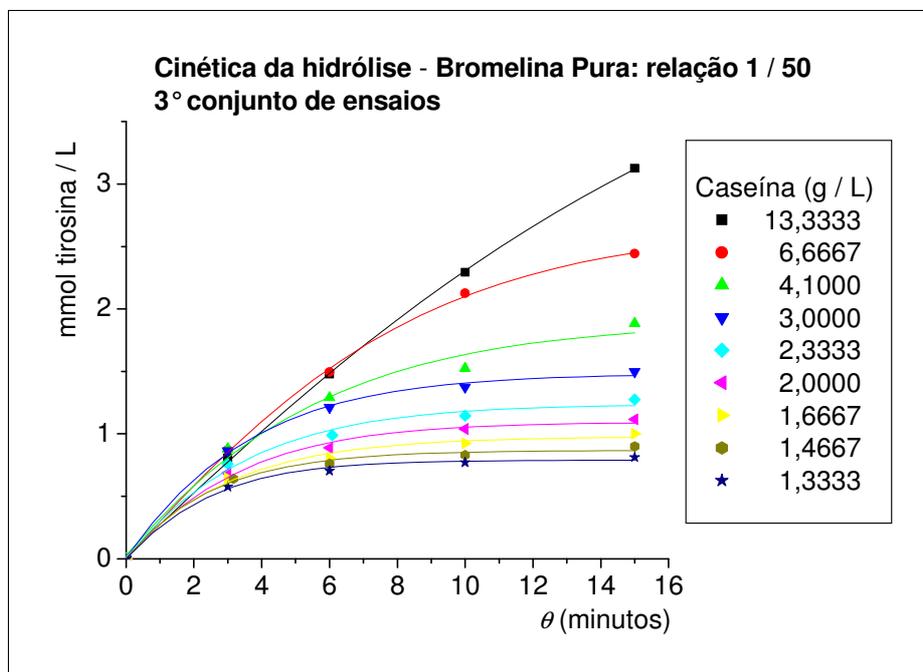
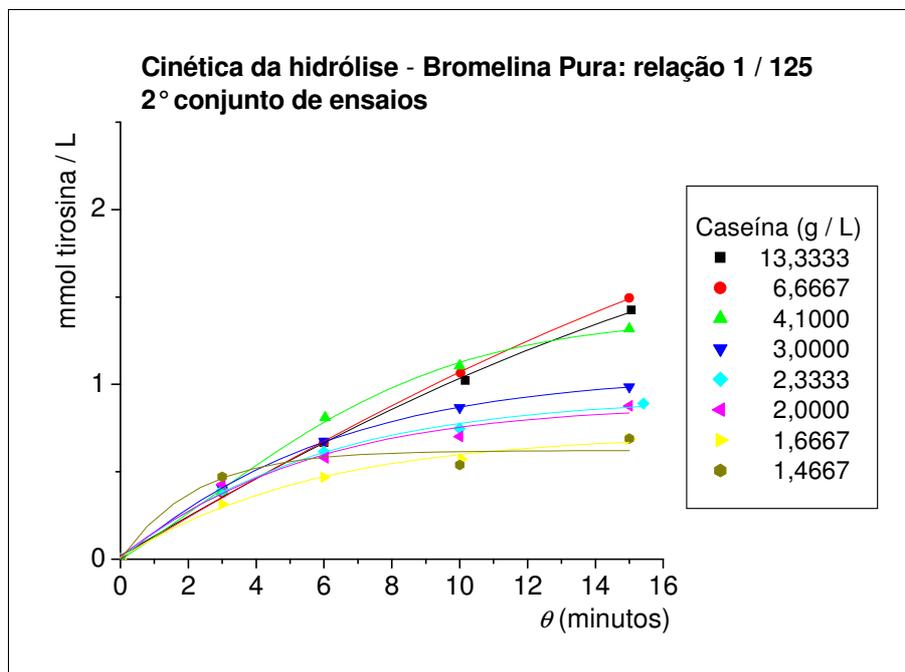


Figura 4.52 – Concentração de tirosina em função do tempo para bromelina pura, relação 1 / 50: 3° conjunto de ensaios.

APÊNDICE XIII



Observação: ensaio para caseína 1,3333 g / L foi perdido.

Figura 4.55 – Concentração de tirosina em função do tempo para bromelina pura, relação 1 / 125: 2º conjunto de ensaios.

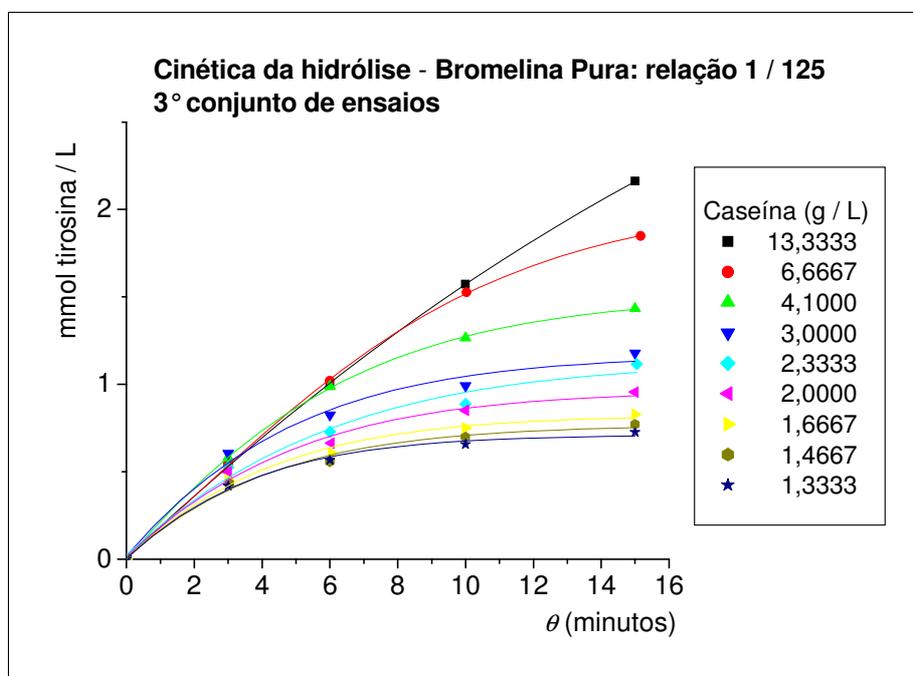


Figura 4.56 – Concentração de tirosina em função do tempo para bromelina pura, relação 1 / 125: 3º conjunto de ensaios.

APÊNDICE XIV

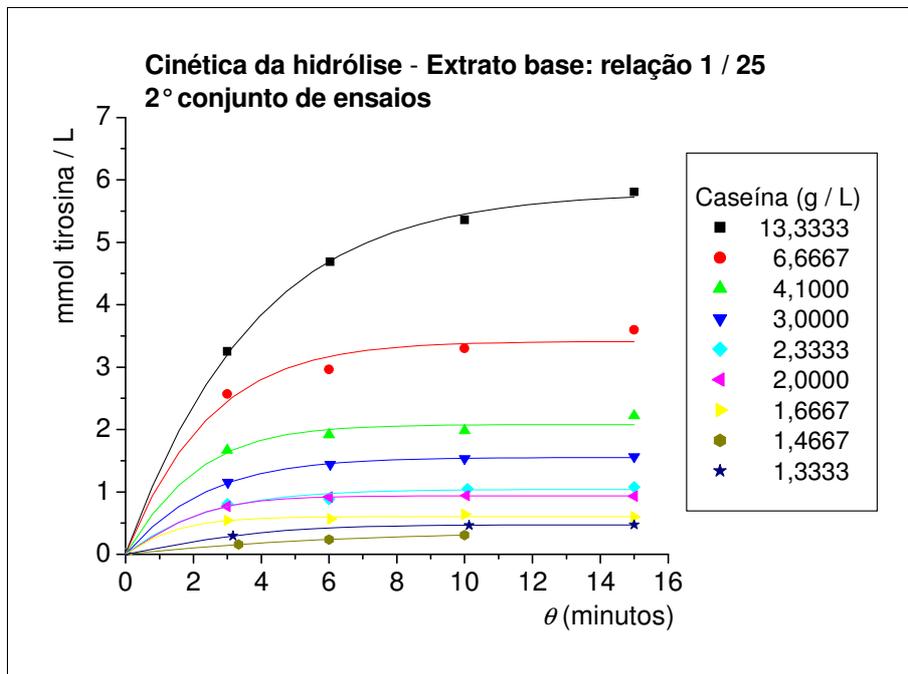


Figura 4.59 – Concentração de tirosina em função do tempo para o extrato, relação base 1 / 25: 2º conjunto de ensaios.

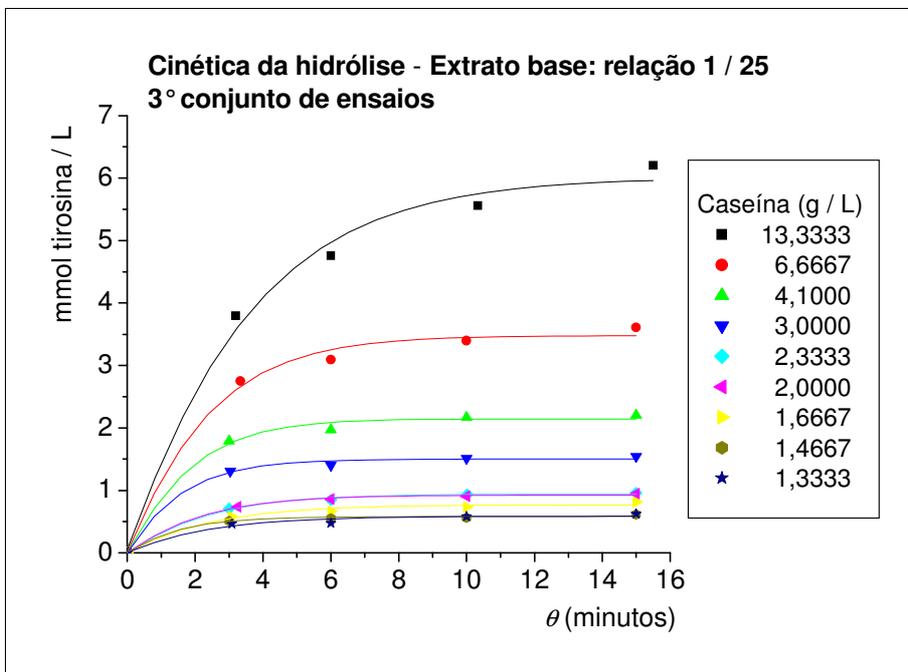


Figura 4.60 – Concentração de tirosina em função do tempo para o extrato, relação base 1 / 25: 3º conjunto de ensaios.

APÊNDICE XV

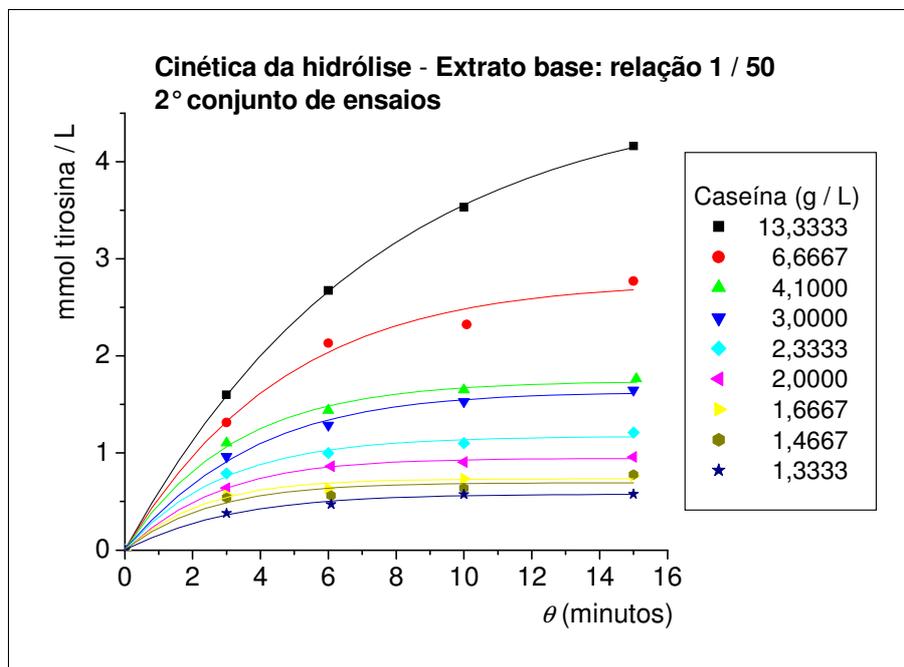


Figura 4.63 – Concentração de tirosina em função do tempo para o extrato, relação base 1 / 50: 2° conjunto de ensaios.

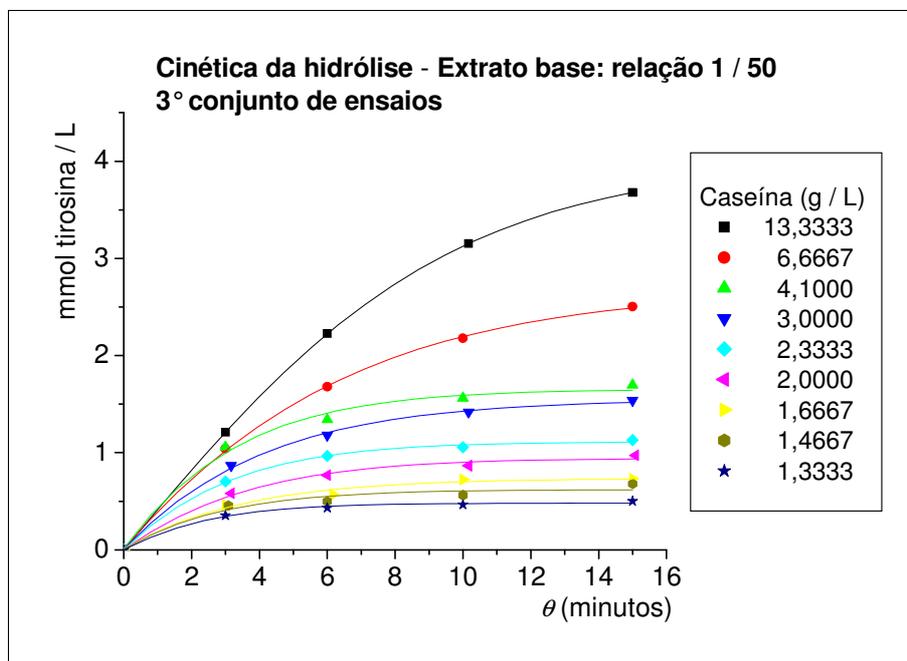


Figura 4.64 – Concentração de tirosina em função do tempo para o extrato, relação base 1 / 50: 3° conjunto de ensaios.