

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DIRETORIA DE GRADUAÇÃO E EDUCAÇÃO PROFISSIONAL
COORDENAÇÃO DO CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS QUÍMICOS

LUIZ HENRIQUE CAPONI

**APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DE ABACAXIZEIRO PARA
EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BROMELINA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TOLEDO
2016

LUIZ HENRIQUE CAPONI

**APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DE ABACAXIZEIRO PARA
EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BROMELINA**

Projeto de trabalho de conclusão de Curso apresentado a Coordenação do Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos – COPEQ – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR Campus Toledo, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Fiori Zara

TOLEDO
2016

**TERMO DE APROVAÇÃO
DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

LUIZ HENRIQUE CAPONI

**APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DE ABACAXIZEIRO PARA EXTRAÇÃO E
PURIFICAÇÃO DE BROMELINA**

Trabalho apresentado como forma de avaliação para o Trabalho de Conclusão de Curso do curso de Tecnologia em Processos Químicos da UTFPR, Campus Toledo, e aprovado pela banca examinadora abaixo.

Prof Dr Ricardo Fiori Zara

Prof^a M.Sc. Michelle Maria Detoni Zanette

Dr^a Alessandra Maria Detoni

Toledo, Novembro de 2016.

*A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso.

RESUMO

A bromelina é uma enzima proteolítica encontrada na haste, folha, raiz e no fruto do abacaxizeiro. Sua importância econômica está relacionada com a indústria farmacêutica e alimentícia, sendo muito utilizada em cervejas, tratamento de distúrbios digestivos, detergentes, além de diversos outros usos. Uma das vantagens de sua utilização é a alta concentração, mesmo após o amadurecimento do fruto. Este trabalho utilizou como principal matéria-prima resíduos (caule, coroa, casca e núcleo) do fruto abacaxi da cultivar *Smooth cayenne*, obtidas da estação experimental do IAPAR de Santa Helena, em 19 de janeiro de 2016. O objetivo principal foi extrair e purificar o grupo de enzimas proteolíticas bromelina, através da precipitação com etanol a 80%, encontrado em diferentes partes do abacaxizeiro consideradas resíduos. Após a colheita o material foi embalado a vácuo e armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, até o processamento e análise. O extrato do resíduo foi obtido com um extrator de sucos, centrifugado a 4000 RPM por 20 minutos para a obtenção do extrato bruto. O extrato de bromelina foi obtido através da precipitação com etanol a 80% em baixa temperatura. Para determinação de atividade enzimática foi aplicado o método de digestão da caseína, como descrito por Kunitz(1947). Para quantificação de proteínas foram realizados ensaios com a metodologia de Bradford (1976). Foram encontrados teores de proteína de 0,06, 0,82, 0,42 e 0,04 mg mL^{-1} , para cascas, caule, coroa e núcleo respectivamente. Para a preparação do extrato de bromelina, foram separadas as amostras de caule. O teor de proteínas encontrado para o purificado foi de 2,51 mg mL^{-1} . Foram encontrados valores de 97,21 U mL^{-1} de atividade enzimática para o extrato de bromelina do caule e atividade específica de 38,73 U mg^{-1} . O fator de purificação foi de 8,82 vezes. Portanto, é interessante trabalhar com os resíduos do caule do abacaxi, pois apresentam maior teor de proteínas e maior atividade enzimática. O método é eficiente para purificação de enzimas e para concentração de proteínas. A purificação utilizando etanol apresentou-se potencialmente eficiente e de baixo custo.

Palavras-chave: Abacaxizeiro. Bromelina. Precipitação com Etanol.

ABSTRACT

Bromelain is a proteolytic enzyme found on the stem, leaf, root and fruit of the pineapple. Its economic importance is related to the pharmaceutical and food industry, being much used in beers, treatment of digestive disorders, detergents, besides several other uses. One of the advantages of its use is the high concentration, even after the ripening of the fruit. This work used as main raw material residues (stem, crown, bark and core) of the pineapple fruit of the cultivar Smooth cayenne, obtained from the experimental station of IAPAR of Santa Helena, on January 19, 2016. The main objective was to extract and purify The group of proteolytic enzymes bromelain, through 80% ethanol precipitation, found in different parts of the pineapple considered waste. After harvesting the material was packed in a vacuum and stored at -80°C until processing and analysis. The extract of the residue was obtained with a juice extractor, centrifuged at 4000 RPM for 20 minutes to obtain the crude extract. Bromelain extract was obtained by precipitation with 80% ethanol at low temperature. For the determination of enzymatic activity the casein digestion method was applied, as described by Kunitz (1947). For quantification of proteins, tests were performed using Bradford's methodology (1976). Protein contents of 0.06, 0.82, 0.42 and 0.04 mg mL⁻¹ were found for bark, stem, crown and core respectively. For the preparation of the bromelain extract, the stem samples were separated. The protein content found for the purified was 2.51 mg mL⁻¹. We found values of 97.21 U ml⁻¹ of enzymatic activity for the bromelain extract of the stem and specific activity of 38.73 U mg⁻¹. The purification factor was 8.82 times. Therefore, it is interesting to work with the residues of the pineapple stem, because they present higher protein content and higher enzymatic activity. The method is efficient for purification of enzymes and for concentration of proteins. Purification using ethanol was potentially efficient and low cost.

Keywords: Pineapple. Bromelain. Precipitation with Ethanol.

LISTA DE SIMBOLOS SIGLAS E ABREVIATURAS

cm	Centímetros
g	Gramas
Kg	Quilogramas
°C	Graus Celsius
m	Unidade de Massa
mm	Milímetros
M	Molaridade
mL	Mililitros
N	Normalidade
nm	Nanometros
µL	Microlitros
pH	Potencial Hidrogeniônico
RPM	Rotações por minuto
v	Volume
U\$	Moeda internacional (Dolar)
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta visível
U	Unidade de atividade enzimática

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Abacaxizeiro Cultivar <i>Smooth Cayene</i>	12
Figura 2 - Obtenção Do Extrato Bruto	19
Figura 3 - Extrato De Bromelina Pós Centrifugação.....	21
Figura 4 - Espectrofotômetro UV-Vis.....	22
Figura 5 - Curva De Calibração De Bradford.....	22
Figura 6 - Curva De Calibração De Atividade Enzimática	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Umidade De Cada Tipo De Amostra	26
Tabela 2 - Concentração De Proteína Por Tipo De Amostra.....	26
Tabela 3 - Concentração De Proteínas Extrato Bruto X Extrato De Bromelina	27
Tabela 4 - Resultados extrato bruto x extrato purificado	27

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 OBJETIVOS	11
1.1.1 Objetivo Geral	11
1.1.2 Objetivos específicos	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 ABACAXI.....	12
2.2 BROMELINA	14
2.3 PROCESSO DE SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO	16
2.3.1 Precipitação com Etanol.....	17
2.4 METODOS ANALÍTICOS	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 PREPARO DA AMOSTRA	19
3.2 DETERMINAÇÃO DE UMIDADE	20
3.3 EXTRAÇÃO DE BROMELINA.....	20
3.4 METODOS ANALÍTICOS	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5 CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

O Abacaxizeiro é uma planta pertencente às *Bromeliaceae*, essa classe possui uma grande capacidade de adaptação ao ambiente, surgem e se desenvolvem em vários tipos de habitat, desde ambientes com sombreamento total até aos expostos a pleno sol, locais sob umidade elevada até condições extremamente áridas, do nível do mar até altitudes elevadas, e em clima quente e tropical úmido a frio e subtropical seco. Distribuem-se por ampla área geográfica, desde o centro dos Estados Unidos até as regiões do norte da Argentina e do Chile (VIEIRA, 2006).

A cultivar Smooth cayenne é a mais conhecida e cultivada mundialmente, dada sua qualidade e aceitação comercial. O fruto é, atualmente a parte comercializável da planta. A fruta em calda e suco pasteurizado são os principais produtos e o restante, formado por caule (Talo da planta), folhas, casca, coroa e núcleo (Miolo do fruto), é considerado resíduo agrícola e não tem sido devidamente aproveitado, resultando em desperdício econômico (LEITE, 2010)

A infrutescência do abacaxizeiro pode ser consumida in natura, ou seja, colhida e já consumida, e também processada em forma de sucos, calda e enlatado, o que o atribui uma grande importância comercial. Industrialmente, a parte importante é a polpa, e como só essa parte é utilizada, são gerados resíduos. Estes são uma mistura de casca, folha, haste e coroa, e possui uma quantidade formidável da enzima proteolítica bromelina (VIEIRA, 2006).

Bromelina é um nome comum dado ao conjunto de enzimas proteolíticas dos vegetais da família Bromeliaceae, da qual o abacaxizeiro é o mais conhecido. A bromelina é encontrada na haste, folha, raiz e na infrutescência da planta. Sua produção é pequena se comparada às necessidades do mercado, o que a torna um produto muito interessante devido ao alto valor comercial (SANTOS *et al*, 2009).

A bromelina tem diversas aplicações, todas baseadas em sua atividade proteolítica. Sua importância econômica está relacionada com a produção de fármacos e a sua utilização na indústria alimentícia, na clarificação de cervejas, na fabricação de queijos, no amaciamento de carnes, no preparo de alimentos infantis e dietéticos, no tratamento de distúrbios digestivos, feridas e inflamações, preparo de

colágenos hidrolisados, nas indústrias têxteis, para amaciamento de fibras, na produção de detergentes, entre outros (SANTOS et al, 2009).

A enzima não está presente nos primeiros estágios de desenvolvimento da infrutescência, porém, sua concentração aumenta rapidamente, mantendo-se alta até o amadurecimento, onde tem uma pequena diminuição. Essa é uma das vantagens da utilização das proteases do abacaxizeiro em comparação com outras proteases vegetais (CESAR, 2005).

Diversas alternativas vem sendo buscadas para realizar a extração do Bromelina, uma delas é a precipitação com etanol (CESAR, 2005).

A precipitação com 80% v/v de etanol, a 5°C e no pH original da amostra é uma forma adequada para a recuperação da bromelina presente no fruto do abacaxi com rendimento de cerca de 100%. A vantagem de utilização do etanol como agente de precipitação encontra-se na abundância e baixo custo deste solvente, tornando a recuperação da enzima economicamente interessante. O etanol pode ser reciclado ao processo por operação de destilação, reduzindo impactos ambientais pela liberação de efluentes (SANTOS *et al*, 2009).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Extrair e purificar o grupo de enzimas proteolíticas bromelina, através da precipitação com etanol a 80%, encontrado em diferentes partes do abacaxizeiro consideradas resíduos.

1.1.2 Objetivos específicos

Realizar a extração de enzimas proteolíticas bromelina no caule, coroa, casca e núcleo central do abacaxizeiro.

Determinar qual destas partes da planta e fruto possuem maior concentração de bromelina.

Avaliar a eficiência da extração etílica de enzimas proteolíticas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ABACAXI

O abacaxi é uma infrutescência bastante apreciada nos países tropicais e subtropicais por apresentar excelente sabor e aroma, características que lhe são atribuídos por diversos constituintes químicos tais como os açúcares, os ácidos, os ésteres, os carotenóides e demais constituintes vitamínicos, aminoácidos e protéicos (LEITE, 2010).



Figura 1 - Abacaxizeiro cultivar *Smooth Cayene*

Fonte: Alessandra Maria Detoni (2016)

O abacaxizeiro (Figura 1) é uma planta de origem tropical, mas com uma boa resistência a déficit hídrico. Para ser cultivado com finalidade comercial, precisa que as chuvas sejam de 1000 mm a 1500 mm anuais, bem distribuídos ao longo dos meses. A faixa ótima de temperatura para desenvolvimento é entre 22 e 32 °C, mas pode resistir a temperaturas abaixo de 5 °C e acima de 40 °C por curtos períodos de tempo.(EMBRAPA, 2013)

As cultivares de abacaxi mais plantadas no mundo são Gold (ou MD-2), *Smooth cayene* (Caiene, Havaiano, Ananás), *Singapore spanish*, Pérola, Queen, Española Roja (Red Spanish) e Pérola. A partir de 1996, a cultivar Gold veio

ganhando o lugar da cultivar *Smooth cayene*, predominante até então, e hoje domina o mercado internacional para consumo fresco (EMBRAPA, 2013).

Cerca de 59% da produção mundial de abacaxi está concentrada em seis países. O principal produtor mundial é a Tailândia, seguido pelo Brasil, Filipinas, China, Índia e Costa Rica (THÉ et al, 2010 Apud LEONEL, 2010).

Segundo o LSPA (2015) a área brasileira utilizada para plantação de abacaxi passou de 61992 hectares na safra de 2005 para 96800 hectares na safra de 2014, com a produção passando de 1.528.313 toneladas para 1.731.879 toneladas, um aumento de cerca de 14% na produção (LSPA, 2015).

No Brasil, as cultivares de maior importância são a Pérola, responsável por 88% da produção nacional e quase 100% da produção do nordeste, e a *Smooth cayene*, com plantios concentrados no sudeste, representando 12% da produção nacional. A planta da cultivar *Smooth cayene* apresenta folhas semieretas, com espinhos na base e próximo ao ápice foliar, com um pedúnculo curto (20 cm) e resistente. O abacaxi apresenta formato ovoide ou cilíndrico, pesando entre 1,5 Kg e 2,5 Kg (EMBRAPA, 2013)

O *Smooth cayenne*, tem um considerável teor de açúcares, com 4,5% de sacarose, 2,21% de frutose, 1,45% de glicose, 1,63% de fibras e 0,016% de proteína, 0,8% de ácido cítrico e 0,38% de ácido málico (BARTOLOMÉ et al, 1995 Apud, LEONEL, 2014).

A cultivar *Smooth cayenne* é a mais conhecida e cultivada mundialmente, dada sua qualidade e aceitação comercial. O fruto é, atualmente a parte comercializável da planta. A fruta em calda e suco pasteurizado são os principais produtos e o restante, formado por caule (Talo da planta), folhas, casca, coroa e núcleo (Miolo do fruto), é considerado resíduo agrícola e não tem sido devidamente aproveitado, resultando em desperdício econômico (LEITE, 2010)

O grande percentual de resíduos gerados durante a usinagem, cerca de 60% do peso total do fruto, contém quantidades relativamente altas de Bromelina, uma protease com inúmeras aplicações nas indústrias alimentícias e farmacêuticas, que possui alto valor agregado e que, diferentemente da papaína ou da ficina, não desaparece quando o fruto amadurece gerando assim um número crescente de estudos de processos de recuperação e purificação da mesma (LEITE, 2010).

2.2 BROMELINA

Segundo Ordóñez et al (2005), as enzimas estão presentes na forma natural dos alimentos, pois provem dos tecidos de plantas e animais. A bromelina é uma protease vegetal encontrada no caule, folhas, raízes e no fruto do abacaxi (*Ananas comosus*) e em todas as espécies do gênero *Bromeliaceae*. Nessa classe estão as proteases vegetais, entre elas: a papaína, bromelina, ficina, fastousaina e a quimopapaína. São polímeros que compreendem uma sequência de dezenas ou centenas de partes de aminoácidos (monômeros) ligados por meio de ligações peptídicas (LEITE, 2010).

As proteínas representam cerca de 50 a 80% do peso seco das células, e são, portanto, o composto orgânico mais abundante da matéria viva. São encontradas em todas as partes de todas as células, uma vez que são fundamentais sob todos os aspectos da estrutura e função celulares. Existem muitas espécies diferentes de proteínas, cada uma delas especializada em uma função biológica diversa (FERREIRA, 2011).

As enzimas proteolíticas são encontradas tanto em animais como em vegetais. Em animais, elas participam de importantes processos biológicos, entre os quais: a digestão proteica, a coagulação sanguínea, a morte celular e a diferenciação de tecidos. Em vegetais, as enzimas proteolíticas estão envolvidas nos processos de amadurecimento, de germinação, de diferenciação e morfogênese, de morte celular, de resposta de defesa de plantas a processos de estresse oxidativo, entre outros. Algumas enzimas envolvidas no amadurecimento de frutos, como a ficina (figo), a papaína (mamão) e a bromelina (abacaxi), podem ser extraídas em grandes quantidades e representam por isso uma significativa importância econômica (QUIMICA NOVA, 2008).

Na indústria alimentícia, a bromelina sofre concorrência com a papaína, que apresenta menores custos sendo esta, mais largamente utilizada, na fabricação de cerveja, contudo seu valor de mercado ainda é elevado. O valor do extrato bruto no mercado internacional fica entre U\$ 50,00 e 200,00/kg na China, sem custos de importação, contudo no mercado nacional valores da Sigma-Aldrich é de R\$ 8850,0/kg. Segundo Cesar (2005) o custo de produção do extrato no Brasil no ano de 2005 era de 1289,00/kg segundo método estudado (CESAR, 2005).

Existem dois tipos distintos de bromelina no abacaxi, a da haste e a da infrutescência, que são deferentes basicamente na sequência de aminoácidos de sua composição. A bromelina produzida e utilizada na indústria é uma mistura das duas (LEITE, 2010).

A possibilidade de obter enzimas em grande escala e a preços razoáveis levou a indústria alimentícia a considerar a ideia de usar enzimas exógenas na produção de alimentos (ORDÓÑEZ, 2005).

O caule do abacaxi é uma das partes de maior concentração de bromelina. No entanto, a infrutescência também é uma alternativa de matéria-prima devido ao fato de que a enzima presente neste apresenta uma atividade proteolítica maior que a do caule. Existem dois tipos distintos de bromelina do abacaxi, a do caule e a da fruta, que diferem basicamente na sequência de aminoácidos de sua composição, são imunologicamente diferentes. A bromelina produzida e utilizada industrialmente é uma mistura das duas. Nos primeiros estágios de desenvolvimento do fruto do abacaxizeiro, os tecidos mais atrasados no amadurecimento, especialmente aqueles ainda suculentos, contêm pouca ou nenhuma atividade de bromelina, porém seu nível aumenta rapidamente, mantendo-se elevado até o amadurecimento. Durante a maturação ocorre uma diminuição da atividade proteolítica, mas, mesmo assim, o abacaxi é o único fruto que possui concentrações relativamente altas de protease no estado maduro. Essa é uma das vantagens da utilização das proteases do abacaxi em comparação com proteases de outros frutos (LEITE, 2010).

Apesar da diminuição da atividade proteolítica durante o amadurecimento, o abacaxizeiro é o único que possui concentrações relativamente altas de enzimas proteolíticas no estado maduro. No mamão e no figo, a papaína e a ficina, somente são encontradas em altos níveis quando o fruto está verde, quando maduras, a concentração das proteases praticamente desaparecem (LEITE, 2010).

Graças à atividade proteolítica da bromelina, ela tem diversos tipos de utilização. Atuam hidrolisando proteínas e polipeptídeos para render peptídeos de peso molecular mais baixo. As proteases são utilizadas na eliminação da turbidez da cerveja, uma vez que quebram as proteínas residuais que deixam a cerveja turva, são usadas em produtos de confeitaria, para quebrar as proteínas do glúten, controlando a viscosidade durante a manipulação e modificando a textura e a

aparência final, nas indústrias têxteis para amaciamento de fibras, também nas indústrias cárneas, são empregadas para acelerar o processo de maturação da carne e melhorar sua maciez, além de diversas utilizações para usos terapêuticos (ORDÓÑEZ, 2005).

Além desses a bromelina é usada na produção de detergentes e em composições cosméticas (LEITE, 2010).

A possibilidade de obter enzimas em grande escala e a preços razoáveis levou a indústria alimentícia a considerar a ideia de usar enzimas exógenas na produção de alimentos (ORDÓÑEZ, 2005).

Diversas alternativas vem sendo buscadas para realizar a extração do Bromelina, uma delas é a precipitação com etanol. O solvente destrói a camada de hidratação hidrofóbica em torno das zonas hidrófobas e passa a circundar tais regiões devido à maior solubilidade destas em meio ao solvente. Com isso, as regiões carregadas com carga positiva ou negativa da superfície da proteína podem interagir, atraindo-se umas às outras, formando agregados. As interações do solvente com as zonas hidrófobas internas causam uma desconformação irreversível da proteína (CESAR, 2005).

2.3 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO

A purificação de proteínas traz muitas dificuldades e exige um elevado número de etapas. A remoção dos fragmentos das células é difícil devido ao pequeno tamanho das partículas e à alta viscosidade da solução. As etapas de concentração podem levar a baixos rendimentos e baixa reprodutibilidade. Os procedimentos de alta purificação, como a cromatografia, são limitados pela escala de operações e pelo custo das resinas. Por isso, a extração líquido-líquido vem despertando grande interesse, a fim de ser utilizada como uma etapa intermediária de separação, que substitui métodos de separação mais caros ou diminui o número de etapas de separação necessárias ao processo (FERREIRA, 2007).

A solubilidade de uma proteína específica em solução aquosa depende da composição do solvente e do pH, conseqüentemente, a variação destes parâmetros fornece uma maneira de purificar proteínas por precipitação fracionada. Para solubilizar proteínas, a água constituinte das soluções proteicas é forçada a entrar

em contato com os grupos hidrofóbicos, predominantes no interior da proteína e em menor frequência localizados na superfície, tornando-os ordenados (COÊLHO, 2012).

Quando os sais são adicionados ao sistema, as moléculas de água solvatam os íons de sal e, com o aumento da concentração do mesmo, a água de solvatação das proteínas são removidas. A exposição das regiões hidrofóbicas de uma molécula de proteína possibilita a ocorrência de interações entre esta e outra, resultando em um aglomerado proteico. Assim, as proteínas com grupos hidrofóbicos mais extensos (ou maior número destes) irão agregar e precipitar antes daquelas com grupos menores, ou em menor número, resultando em um fracionamento. Esta técnica de extração parece ser especialmente adequada para as primeiras etapas dos procedimentos de separação, mas pode substituir etapas cromatográficas ou ser aplicada antes da cromatografia (COÊLHO, 2012).

2.3.1 Precipitação com Etanol

O solvente destrói a camada de hidratação hidrofóbica em torno das zonas hidrófobas e passa a circundar tais regiões devido à maior solubilidade destas em meio ao solvente. Com isso, as regiões carregadas com carga positiva ou negativa da superfície da proteína podem interagir, atraindo-se umas às outras, formando agregados. As interações do solvente com as zonas hidrófobas internas causam uma desconformação irreversível da proteína (CESAR, 2005).

A bromelina do fruto é uma proteína ácida, e seu ponto isoelétrico foi determinado por focalização isoelétrica como pH 4,6. Para evitar a desnaturação o solvente deve ser usado resfriado adicionado lentamente sob agitação, ou seja, o processo deve ser efetuado em baixas temperaturas da ordem de zero ou abaixo, pois nestas condições a flexibilidade da molécula é menor, reduzindo a capacidade de penetração do solvente e a desnaturação irreversível das proteínas, sendo que, os álcoois de cadeia mais longa apresentam maior efeito desnaturante do que os de cadeia mais curta (SCOPES, 1994, citado por CESAR, 2005).

Segundo Cesar (2005), a precipitação com 80% v/v de etanol, a 5°C e no pH original da amostra é uma forma adequada para a recuperação da bromelina presente no fruto do abacaxi com rendimento de cerca de 100%. A vantagem de

utilização do etanol como agente de precipitação encontra-se na abundância e baixo custo deste solvente, tornando a recuperação da enzima economicamente interessante. O etanol pode ser reciclado ao processo por operação de destilação, reduzindo impactos ambientais pela liberação de efluentes (SANTOS *et al*, 2009).

2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

O método de Bradford é uma técnica para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante de “Coomassie brilliant blue” BG-250. Este método é baseado na interação entre o corante e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm (QUIMICA NOVA, 1998).

O método de Bradford é mais rápido e prático que o método de Lowry e Cols, além de ser menos sujeito a interferentes (QUIMICA NOVA, 1998).

Para a determinação da atividade proteolítica da enzima, é utilizado o método da digestão da caseína (KUNITZ, 1947).

Este método baseia-se na quantidade de proteases no extrato podendo ser quantificada por meio de ensaios em que se determina sua atividade catalítica. A atividade das proteases é dependente da concentração das enzimas e do substrato, do pH, da temperatura e do tempo de reação e, em tecidos vegetais, pode ser determinada utilizando-se a caseína como substrato. A mudança de coloração indica a quantidade de enzimas presentes no extrato, sendo feita a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 280nm (KUNITZ, 1947).

Uma unidade (U) de atividade é a quantidade de enzima que catalisa a transformação de um μmol de substrato ou a formação de um μmol de produto por minuto”, nas estabelecidas condições do ensaio (COELHO, 2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PREPARO DA AMOSTRA

Este trabalho utiliza como principal matéria-prima resíduos (caule, coroa, casca e núcleo) do abacaxizeiro da cultivar *Smooth cayenne*, doadas da estação experimental do IAPAR de Santa Helena, em 19 de janeiro de 2016.

As amostras foram recebidas e lavadas para retirada de impurezas, logo após foram separadas por tipo de amostra sendo elas, caule da planta, coroa, casca e núcleo-central do fruto, e fatiadas. Para melhor homogeneidade, as mesmas foram trituradas em um processador de alimentos industrial. Em seguida as amostras passaram por extração de suco em um extrator de sucos da marca Black e Decker® modelo Juice Extractor JE1500 de uso doméstico, com a adição de água ultrapura na proporção de 50% m/m. O obtido no extrator foi previamente peneirado em peneira fina para retirada das fibras maiores. Este extrato então foi centrifugado a 4000 RPM por 20 minutos, resultando no que é mostrado na Figura 2. O material precipitado na etapa de centrifugação foi separado por filtração com gazes estéreis e descartado. O sobrenadante foi armazenado em frascos estéreis e identificado como extrato bruto, armazenado em ultrafreezer a -80°C .

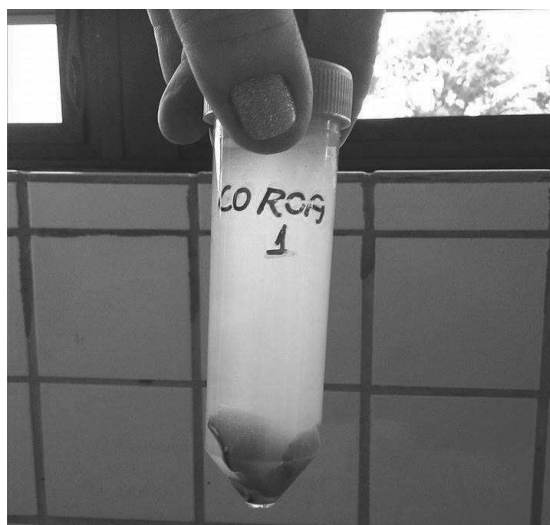


Figura 2 - Obtenção Do Extrato Bruto

Fonte: O Autor (2016)

3.2 DETERMINAÇÃO DE UMIDADE

Para determinação de umidade a metodologia utilizada foi a do Instituto Adolfo Lutz (2008). Doze cápsulas de porcelana foram secas por três horas em estufa, três para cada parte do abacaxizeiro, após a pesagem de aproximadamente cinco gramas de amostra, as cápsulas foram colocadas em estufa a 105° C, após três horas as cápsulas foram retiradas da estufa e depositadas em um dessecador com sílica, para evitar contato com a umidade do ar. Após conferido o peso, as cápsulas foram recolocadas na estufa, e este processo foi repetido até que se obtivesse peso constante.

3.3 EXTRAÇÃO DE BROMELINA

A extração de bromelina foi feita pelo método de precipitação com 80% de etanol a frio. O etanol foi armazenado em freezer a 0° C por uma hora antes do início da extração. Foram medidos 10 mL de cada amostra com pipeta volumétrica em falcons de 50 mL. Com o auxílio de uma bureta, e um banho gelado (2 – 5 °C), 40 mL de etanol, representando 80% do volume, foram adicionados à amostra, gotejados lentamente, para evitar variações bruscas de temperatura.

Após quinze minutos, tempo aproximado para que o etanol desestabilize a camada hidrófoba das proteínas, as amostras foram centrifugadas em centrífuga a 3000 RPM por 20 minutos. A seguir, o sobrenadante foi descartado, e ao precipitado, foram adicionados 2 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0.

O produto desta etapa foi chamado extrato de bromelina, que pode ser visto na figura 3, do qual foi retirada uma alíquota de 0,2 mL para determinação de atividade enzimática (digestão da caseína) e 90 µL para quantificação (método de Bradford), como é descrito a seguir.



Figura 3 - Extrato De Bromelina Pós Centrifugação

Fonte: O Autor (2016)

3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

A determinação da concentração de proteínas totais foi realizada pelo Método de Bradford utilizando uma curva padrão de Albumina do Soro Bovino (BSA). Foram adicionados com pipeta automática 90 μL de cada uma das amostras em tubos de ensaio. Às amostras foram adicionados 10 μL de hidróxido de sódio 1N e homogeneizado em agitador do tipo Vortex, então foram adicionados 5 mL do Reagente de Bradford e novamente agitado em Vortex. Com respeito ao prazo de no máximo uma hora, foram realizadas leituras de absorvância em espectrofotômetro UV-VIS da marca Gênesis modelo 10 UV (Figura 4) e em cubetas de vidro, com caminho óptico de 1 centímetro, no comprimento de onda de 595 nm, onde o corante comassie absorve fortemente (BRADFORD, 1976).



FIGURA 4 - Espectrofotômetro Uv-Vis

Fonte: O Autor (2016)

Uma curva de calibração com oito pontos foi preparada para a obtenção da equação da reta, como pode ser visto na figura 5, onde os valores obtidos das leituras foram calculados para determinar a quantidade de proteínas.

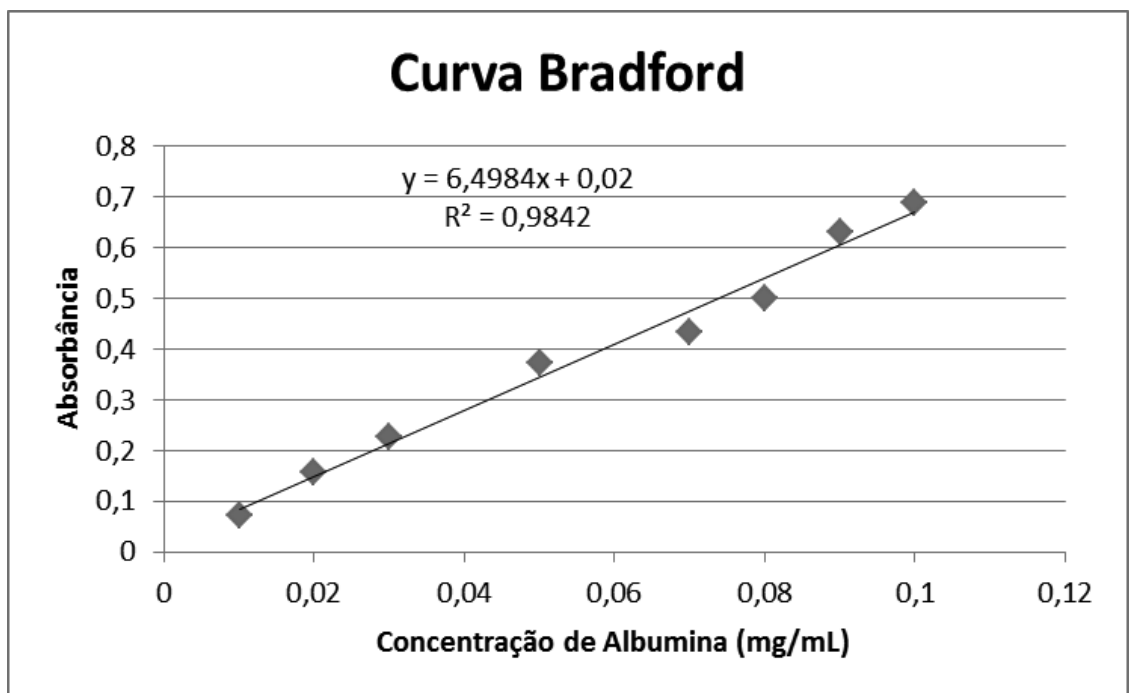


FIGURA 5 – Curva De Calibração De Bradford

Fonte: O Autor (2016)

Para a determinação da atividade proteolítica da enzima, foi utilizado o método da digestão da caseína. Para isso, foram pipetados 2,5 mL da solução de substrato de caseína em tubos de ensaio com tampas, então estes ficaram em banho-maria a 37° C por cinco minutos. Após o banho, foram adicionados 0,2 mL de cada amostra, e agitados em agitador Vortex, e novamente levado para o banho a 37° C por dez minutos. Depois de retirado do banho foram adicionados 5 mL de Ácido tricloroacético 0,3 M e colocado em repouso por 10 minutos em temperatura ambiente. A centrifugação foi feita a 4000g por 20 minutos e posteriormente realizada a leitura de absorbância, em cubeta de quartzo, caminho óptico de 1 centímetro, e comprimento de onda de 280 nm, em espectrofotômetro UV-VIS da marca Gênese modelo 10 UV (Figura 4) (KUNITZ, 1947 adaptado por CAMPOS, 2007).

Uma curva de calibração com oito pontos foi preparada para a obtenção da equação da reta, como pode ser visto na figura 6, onde os valores obtidos das leituras foram calculados para determinar a atividade enzimática.

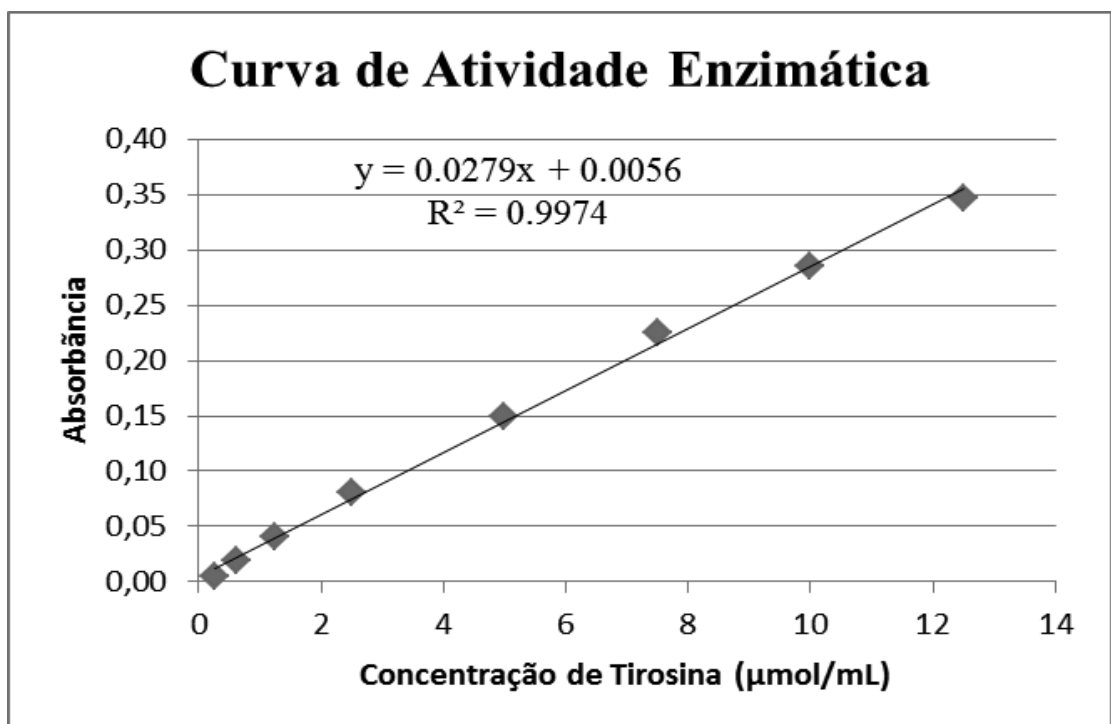


FIGURA 6 – Curva De Calibração De Atividade Enzimática

Fonte: O Autor (2016)

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa Assistat Beta 5.3, onde foram aplicadas análise de variância ANOVA e teste de Tukey.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de umidade encontrados para as amostras de abacaxizeiro foram de 90,59% para caule, 82,73% para coroa, 88,20% para o núcleo e 80,10% para casca, valores que coincidem com os encontrados por Leonel (2014), que são de 82,23% para cascas e com Gondim et al (2005) que encontrou valores de 78,13% de umidade para as cascas. Estes valores podem ser vistos na Tabela 1.

Tabela 1 – Umidade de cada tipo de amostra

AMOSTRA	TEOR DE UMIDADE (%)
Casca	80,10 d +/- 0,24
Caule	90,59 a +/- 0,27
Coroa	82,73 c +/- 0,25
Núcleo	88,20 b +/- 0,26

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

O teste de Tukey foi aplicado ao nível de confiança de 95%

Os resultados obtidos para cada tipo de amostra demonstraram que o caule e a coroa são as partes que possuem maior concentração de proteínas, com uma quantidade muito superior às outras, casca e núcleo (Tabela 2). As letras diferentes na tabela expressam que há diferença significativa entre as amostras de caule e coroa, isso é visto uma vez que o caule possui uma concentração duas vezes maior que a coroa, portanto, muito mais suscetível à extração.

Tabela 2 – Concentração de proteína por tipo de amostra

AMOSTRAS	CONCENTRAÇÃO (mg mL ⁻¹)
Casca	0,06c
Caule	0,82a
Coroa	0,42b
Nucleo	0,04c

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

O teste de Tukey foi aplicado ao nível de confiança de 95%

Na determinação do conteúdo de proteínas (Tabela 3) verificou-se 0,82 mg mL⁻¹ para o extrato bruto do caule, e após o processo de extração por precipitação com etanol a 80%, o valor obtido foi de 2,51 mg mL⁻¹, obtendo-se assim, um extrato 3,06 vezes mais concentrado de proteínas.

Tabela 3 – Concentração de proteínas nos extrato bruto e extrato purificado

AMOSTRAS	CONCENTRAÇÃO (mg mL ⁻¹)
Extrato Bruto	0,82 b
Extrato Purificado	2,51 a

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.
O teste de Tukey foi aplicado ao nível de confiança de 95%

Os valores de atividade enzimática encontrados foram de 39,68 U mL⁻¹ para o extrato bruto e 97,21 U mL⁻¹, uma recuperação enzimática de cerca de 2,45 vezes, assim como o encontrado por Coêlho (2012), que diz ter uma recuperação de 3 a 5 vezes, demonstrando um aumento significativo na atividade, e conseqüentemente uma quantidade maior de enzimas.

Tabela 4 – Resultados extrato bruto x extrato purificado

Amostra	Extrato Bruto	Extrato purificado
Proteínas (mg mL ⁻¹)	0,82	2,51
Atividade Enzimática (U mL ⁻¹)	39,68	97,21
Atividade Específica (U mg ⁻¹)	4,39	38,73
Recuperação Enzimática	-	2,45
Fator de Purificação	-	8,82

Martins (2014) encontrou valores de 2,45 para o fator de purificação com extrações de bromelina utilizando 70% de etanol, já Coêlho (2012), utilizando PEG 4000 e sulfato de amônio obteve um fator de purificação de 11,80 vezes. Considerando que o fator de purificação é calculado dividindo-se a atividade enzimática após a extração pela atividade enzimática antes da extração, os valores encontrados neste trabalho podem ser relacionados, sendo encontrados 8,82.

5 CONCLUSÃO

Com a realização deste trabalho foi possível concluir que a maior concentração de proteínas e enzimas podem ser encontradas no caule do abacaxizeiro. Também no caule foi identificado a maior atividade enzimática. Os procedimentos são confiáveis confiáveis, com curvas de calibração muito bem ajustadas. O método além de eficiente para purificação de enzimas também é eficiente para concentração de proteínas, tendo um aumento médio de 3,06 vezes quando comparado ao teor de proteínas na amostra antes da purificação.

O fator de purificação encontrado para o método de precipitação com etanol a 80% foi 8,82 quando comparado com o extrato bruto.

REFERÊNCIAS

BRADFORD, M. M. *Analytical Biochemistry*, V. 72, páginas 248-254, Editora Elsevier, 1976.

BRESOLIN, I; R; A; P; Purificação da enzima bromelina de resíduos de abacaxi para estudo de estabilidade em bases Dermatológicas. Dissertação de Mestrado, Campinas-SP, 2013.

CAMPOS, E. S., Purificação e Caracterização de Bromelina a Partir do Extrato Bruto de Ananas comosus por Adsorção em Leito Expandido. Dissertação de Mestrado, Autor: Edgar Silveira Campos, Campinas –SP, 2007.

CESAR, A. C. W., Análise de Viabilidade Econômica de um Processo de Extração e Purificação da Bromelina do Abacaxi, Tese de Doutorado. Autora: Ana Claudia Wabiszczewicz Cesar, Campinas – São Paulo, 2005.

COÊLHO, D. F., Purificação de Bromelina dos Resíduos de Abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill) por Precipitação integrada a Sistema Bifásico Aquoso (PEG/Sulfato de Amônio) não Convencional. Dissertação de Mestrado, Autor: Diego de Freitas Coêlho, Campinas –SP, 2012.

DE-GIULI, M.; PIROTTA, F. Bromelain: interaction with some protease inhibitors and rabbit specific antiserum. *Drugs Exp Clin Res*, V. 4, p. 21-23, 1978.

EMBRAPA et al, Abacaxi: O Produtor Pergunta, a Embrapa Responde. 2ª Edição. Brasília-DF. Embrapa, 2013.

FERREIRA, J. F., Caracterização e Purificação da Enzima Bromelina em Sistema De Duas Fases Aquosas Peg/Fosfato, Dissertação de Mestrado, Autora: Juliana Ferrari Ferreira, Campinas – SP, 2007.

FERREIRA, J. F., Extração e caracterização da enzima bromelina presente no resíduo do curauá (*Ananas erectifolius* L. SMITH), Tese de Doutorado, Autora: Juliana Ferrari Ferreira, Campinas – SP, 2011.

GONDIM, J.A.M.; MOURA, M.F.V.; DANTAS, A.S.; MEDEIROS, R.L.S.; SANTOS, K.M. Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.25, n.4, p.825-827, 2005.

HARRACH, T. *et al.* Isolation and Characterization of Two Forms of an Acidic Bromelain Stem Proteinase. *Journal of Protein Chemistry*, V. 17, n. 4, p. 351-361, 1998.

INOUE, K. *et al.* Effect of etodolac on prostaglandin E2 biosynthesis, active oxygen generation and bradykinin formation. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, V. 51, n. 6, p. 457-462, 1994.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4ª Edição. São Paulo, 2008, p. 98-102.

KUNITZ, M; Crystalline soybean Trypsin Inhibitor, II. General properties. *Journal of General Physiology* V. 30, no. 4, p. 291-310, 1947.

LEITE, N. S., Purificação Parcial e Caracterização da Enzima Bromelina do Abacaxi Cultivar Pérola. Dissertação de Mestrado. Autor: Nadjma Souza Leite, SERGIPE, 2010.

LEONEL, S., LEONEL, M., SAMPAIO, A. C., Processamento de frutos de abacaxizeiro CV smooth cayene: Perfil de açúcares e ácidos dos sucos e composição nutricional da farinha de cascas. *Revista Brasileira de Fruticultura*, V. 36, n. 2, p. 433-439. Jaboticabal, São Paulo, 2014.

LEUNG, A. Y.; FOSTER, S. S. *Encyclopedeia of Common Natural Ingredients Used in Foods, Drugs, and Cosmetics*. New York, NY: John Wiley & Sons, 1980. 880.

LSPA, Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, Rio de Janeiro, RJ, 2015. V. 29, n. 1

MARTINS, B. C. *et al.* Characterization of Bromelain from Ananas Comosus Agroindustrial Residues Purified by Ethanol Fractional Precipitation. Disponível em: <<http://www.aidic.it/c-et/14/37/131.pdf>>. Acesso em 25 de Setembro de 2016, as 16h30min.

MORITA, A. H. *et al.* Chromatographic fractionation and characterization of the active plate-let aggregation inhibitory factor from bromelain. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, V. 239, n. 2, p. 340-50, 1979.

ORDÓÑEZ, J. A., *et al*, Tecnologia de Alimentos, Editora: Artmed, V. 1, Porto Alegre, 2005, p. 94-95.

REDAÇÃO NORDESTE RURAL, Um jeito de produzir abacaxi na entre safra, de 17 de Janeiro de 2015. Disponível em: < <http://nordesterural.com.br/um-jeito-de-produzir-abacaxi-no-periodo-de-entressafra/>>, Acesso em: 2 de Junho de 2015, as 15h50min.

REVISTA QUIMICA NOVA, Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: Van-tagens e Desvantagens dos métodos existentes, Volume: 21, Edição: 6, de 1998. Disponível em: <http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol21No6_7-87_v21_n6_%28-19%29.pdf>, Acesso em: 1 de Abril de 2015, às 21h30min.

REVISTA QUIMICA NOVA, Estudo da atividade proteolítica de enzimas presentes em frutos, Volume: 28, Edição: 8, de 2008. Disponível em:< <http://qnesc.sbq.org.br/on-line/qnesc28/11-EEQ-6906.pdf> >, Acesso em: 23 de maio de 2016,às 8h15min.

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

SANTOS, A. F., ALVES R. S., LEITE N. S., FERNANDES R. P. M., Estudo Bioquímico Da Enzima Bromelina Do Ananas Comosus (Abacaxi). Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão- SE, Aceito em Novembro de 2009.

SILVA, A. R. G. Estudos Termodinâmicos em Sistemas de Duas Fases Aquosas para a Purificação de Bromelina de Resíduos Agroindustriais, Dissertação de Mestrado, Autor: André Rodrigues Gurgel da Silva, Campinas – SP, 2014.

SILVEIRA, E. *et al*. Expanded bed adsorption of bromelain (E.C. 3.4.22.33) from Ananas comosus crude extract. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 26, p. 149-157, 2009.

THÉ, P.M.P.; NUNES, R.P.; MOREIRA DA SILVA, L.I.M.; ARAÚJO, B.M. Características físicas, físico-químicas, químicas e atividade enzimática de abacaxi Cv Smoth Cayene recém-colhido. *Alimentos e Nutrição, Araraquara*, v.21, n.2, 2010.

UHLIG, G.; SEIFERT, J. The effect of proteolytic enzymes (traumanase) on posttraumatic edema. *Fortschr Med*, v. 99, n. 15, p. 554-556, 1981.

VIEIRA, R. F., *et al*, Frutas Nativas da Região Centro-Oeste, 1º Edição, Brasília-DF, Editora Embrapa, 2006.

WHITE, R. R.; CRAWLEY, F. E. H.; VELLINI, M.; ROVATI, L. A. Bioavailability of bromelain after oral administration to rats. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, v. 9, n. 4, p. 397-403, 1988.

ZAINAL S, *et al* Efficacy of selected purification techniques for bromelain. *International Food Research Journal*. V. 20, p. 43-46, 2013.