

Extração e caracterização de uma enzima proteolítica do curauá (*Ananas Erectifolius*)

Extraction and characterization of a proteolytic enzyme from Ananas Erectifolius

Juliana Ferrari Ferreira

Mestre em Engenharia Química – Depto. de Engenharia de Sistemas Químicos, Faculdade de Engenharia Química – Unicamp. Campinas, SP [Brasil]
jferrarif@hotmail.com

Dalva Sbruzzi

Mestre em Engenharia Química - Depto. de Engenharia de Sistemas Químicos, Faculdade de Engenharia Química – Unicamp. Campinas, SP [Brasil]
dalvasbruzzi@gmail.com

Kleber Vânio Gomes Barros

Mestre em Engenharia Química - Depto. de Engenharia de Sistemas Químicos, Faculdade de Engenharia Química – Unicamp. Campinas, SP [Brasil]
klebervanio_gomesbarros@yahoo.com.br

Isaac Stringueta Machado

Doutor em Engenharia Química - Depto de Ciências Ambientais, Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu – Unesp. Botucatu, SP [Brasil]
isaac@fca.unesp.br

Elias Basile Tambourgi

Doutor em Engenharia Química - Depto. de Engenharia de Sistemas Químicos – Unicamp. Campinas, SP [Brasil]
eliasam@feq.unicamp.br

O curauá (*Ananas erectifolius*) é uma planta fibrosa encontrada no Norte e Centro-Oeste do Brasil, uma bromeliácea de características físico-químicas que lhe conferem grande potencial de utilização na indústria automobilística, como fonte de fibras. Como toda planta da família Bromeliaceae contém níveis significativos da enzima bromelina, de alto valor comercial e com ampla aplicação também na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética. Neste trabalho, foram realizados testes experimentais de extração da enzima proteolítica do curauá sob diferentes condições de pH e temperatura, medindo-se a atividade enzimática para cada um dos ensaios, utilizando-se o reativo de Biureto e determinando-se a temperatura e pH ótimos de sua utilização, ou seja, valores em que a atividade enzimática da enzima é máxima, com o objetivo de otimizar as condições de uso do resíduo para posterior purificação. Foram utilizadas as duas variedades comercialmente encontradas (branca e roxa). Os resultados mostraram que o curauá possui enzimas com atividade proteolítica, sendo o pH ótimo 8,5 para as duas variedades e temperaturas ótimas de 30 °C para a espécie branca, e 10 °C, 20 °C e 35 °C, para a roxa.

Palavras-chave: *Ananas erectifolius*. Atividade enzimática. Bromelina. Caracterização. pH. Temperatura.

Ananas erectifolius (curauá) is a fibrous vegetable that can be found in North and Central West regions of Brazil. It is a bromeliaceae family plant which physico-chemical features provides great potential in the automobilistic industry as a source of fibers. As commonly described in other bromeliaceae species, it contains significant levels of bromelain, of high commercial value and wide range of applications in food, pharmaceutical and cosmetics industry. In this paper, experimental tests were performed to evaluate the extraction of the proteolytic enzymes of the *Ananas erectifolius* under different pH and temperature conditions to determine in which ones the enzymatic activity would be the maximum for later purification of the bromelain. The two commercially available curauá varieties (white and purple) were used in the experiments and the results showed the same optimal pH of 8.5 for both varieties and different temperatures of 30°C for the white one, and 10°C, 20°C and 35°C for the purple one.

Key words: *Ananas erectifolius*. Bromelain. Characterization. Enzymatic activity. Temperature. pH. Enzyme.

1 Introdução

Nos últimos anos, a procura por produtos naturais tem crescido em todo o mundo. A preocupação com o meio ambiente tornou-se obrigatória para a funcionalidade de algumas indústrias. O escopo dos setores industriais é a utilização de recursos naturais renováveis, que representem fonte alternativa de grande potencial econômico (OLIVEIRA et al., 2008).

O uso de matérias-primas naturais vem sendo objeto de diversos estudos e pesquisas, por seu potencial na substituição de derivados petroquímicos. As fibras vegetais são úteis na indústria automobilística, para o revestimento interno de automóveis, ônibus e caminhões, e na construção civil (MOTHÉ; ARAÚJO, 2004). Ainda, o soro resultante do processamento das folhas pode servir como adubo orgânico.

Entre as espécies da Região Amazônica com potencial para produção de fibras, destaca-se o curauá ou *Ananas comosus* var. *erectifolius* (L. B. Smith) Coppens & F. Leal. No Brasil e no exterior, a fibra dessa planta é submetida à frequentes pesquisas, as quais vêm apresentando resultados significativos, o que torna essa espécie a mais promissora entre as produzidas na Amazônia brasileira (OLIVEIRA et al., 2008).

O emprego de fibras naturais para a produção de compósitos poliméricos contribui para evitar problemas de poluição ambiental, já que sua utilização muitas vezes substitui materiais sintéticos baseados no petróleo. Para atender à crescente demanda, é necessário viabilizar o cultivo de plantas fibrosas por meio da maximização de todas as suas propriedades.

Como toda planta da família *Bromeliaceae*, o curauá apresenta como constituinte a enzima bromelina que possui alto valor comercial e ampla aplicação na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética. A bromelina é uma en-

zima proteolítica da classe das hidrolases. As proteases são hidrolases capazes de romper a ligação peptídica das proteínas e peptídeos. A especificidade das proteases é ampla e classificada de acordo com a constituição de seu sítio ativo em três grupos principais: serina protease, ácido aspártico protease e cisteína protease, sendo a bromelina enquadrada nesse último grupo (PIRES; LEÃO, 2008).

A bromelina tem diversos usos, todos baseados em sua atividade proteolítica. A sua importância econômica está relacionada com a produção de fármacos e a utilização na indústria alimentícia (na clarificação de cervejas, na fabricação de queijos, no amaciamento de carnes, no preparo de alimentos infantis e dietéticos, entre outros), no tratamento de distúrbios, digestivos, feridas e inflamações, preparo de colágenos hidrolisados, nas indústrias têxteis, para amaciamento de fibras e também na produção de detergentes (BALDINI et al., 1993).

A atividade de uma enzima pode ser determinada com base na velocidade de conversão de um reagente adequado (substrato) e está estritamente vinculada aos agentes desnaturantes, pelo fato de sua função catalítica depender da conformação na qual a enzima se apresenta (RIEGEL, 2003). A temperatura, por exemplo, é um dos agentes críticos sobre a atividade das enzimas. Quando se eleva a temperatura, a atividade aumenta, todavia, o processo de desnaturação cresce, em decorrência da ação do calor (HALPERN, 1997).

O pH é outro parâmetro que exerce grande influência na manutenção da atividade enzimática. O efeito desse fator se dá devido às alterações no estado de ionização dos componentes do sistema, em consequência da variação da concentração de $[H^+]$ (RICARDO; TEIXEIRA, 1993).

Machado et al. (2007) analisaram a atividade enzimática da bromelina em plantas de curauá (folha e fruto) por meio da hidrólise enzimática da

caseína a 1,2% (p/v) pH 7,5 a 35 °C, durante dez minutos, seguindo-se de precipitação do substrato não hidrolisado com solução de ácido tricloroacético (TCA). Os resultados obtidos aproximaram-se daqueles observados por Baldini et al. (1993) e César et al. (1999) ao pesquisarem o fruto do abacaxi, matéria-prima comumente utilizada na obtenção comercial da bromelina.

Assim, neste trabalho, objetivou-se extrair e quantificar a atividade enzimática em diversas condições de pH e temperatura, para assim, obter as melhores condições de utilização da enzima para posterior purificação, utilizando o reativo de Biureto.

2 Materiais e métodos

Os equipamentos utilizados foram: balança eletrônica Marte, modelo AL 200; um multiprocessador Arno; pHmetro *Analyser* pH 300; banho termostatizado FANEM; modelo 100, micropipetas automáticas; espectrofotômetro UV/VIS *Spectronic* 21D.

2.1 Métodos

As folhas do curauá foram coletadas no campo, na fazenda experimental – São Manoel, Botucatu (SP). Chegando ao laboratório foram lavadas com água destilada, secadas em papel toalha e armazenadas em sacos plásticos, sob refrigeração, até sua utilização. É importante ressaltar que a utilização das folhas foi feita em, no máximo, 30 dias após sua colheita e armazenamento. Depois disso, a atividade enzimática diminui bruscamente, tornando inviável a utilização da enzima.

2.2 Preparo das amostras

Foram pesadas, na proporção 1:2 (v/m), solução tampão e folhas de curauá das variedades

branca e roxa. Em seguida, as folhas foram trituradas em um multiprocessador de alta eficiência e filtradas em tela de náilon para retirada de fibras e particulados presentes no extrato.

2.3 Preparo do reativo de biureto

Dissolveu-se 1,5 g de sulfato de cobre pentahidratado e 6,0 g de tartarato duplo de sódio e potássio em 500 mL de água destilada, posteriormente foram adicionados 300 mL de solução de hidróxido de sódio a 10% em constante agitação. A solução final foi avolumada para 1 litro. (ZANCAN, 2005).

2.4 Determinação da atividade da bromelina

Para determinação da atividade da bromelina, utilizou-se o reativo de Biureto e uma solução a 5 g.L⁻¹ de BSA (Albumina de Soro Bovino). O método baseia-se na reação do reativo do Biureto, que é constituído de uma mistura de cobre e hidróxido de sódio com um complexante que estabiliza o cobre em solução. O cobre, em meio alcalino, reage com proteínas formando um complexo quadrado planar com a ligação peptídica. As leituras foram feitas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. Calculou-se a atividade enzimática segundo Ferreira (2007).

2.5 Preparo das soluções tampão

Foram preparadas as soluções tampão com pH 4,5 a 9,5, variando de 1 a 1, a partir de soluções de fosfato de potássio mono e dibásico a 15% (m/m), seguindo a metodologia descrita por Morita e Assumpção (1995). Para isso, prepararam-se soluções padrão de fosfato de potássio monobásico (solução A) e fosfato de potássio bibásico (solução B). Misturou-se em um béquer, contendo um eletrodo de cloreto de prata, para medir o pH do meio, até atingir o pH desejado.

2.6 Determinação da temperatura ótima

Com o pH fixado em 8,5, foram realizados ensaios em batelada para medir a atividade enzimática e quantidade de proteínas totais em amostras a diversas temperaturas, como segue.

Em vários tubos foram colocados 5 mL de solução de BSA 5 g.L⁻¹ em diferentes temperaturas. Essa solução foi deixada durante dez minutos para estabilizar a temperatura no biorrretor. As temperaturas foram: 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C e 50 °C. Os tubos foram devidamente numerados e cuidadosamente mantidos na temperatura desejada.

Com o pH fixado e com as variações de temperatura de cada amostra do extrato do curauá branco e roxo, foi medida a atividade enzimática e a quantidade de proteínas totais, de acordo com a metodologia descrita por Baldini et al. (1993).

2.7 Determinação do pH ótimo

Com a temperatura fixada em 37 °C foi possível também, pelas análises de atividade enzimática e proteínas totais, determinar o pH ótimo da enzima, de acordo com o procedimento descrito a seguir.

Foram adicionadas ao extrato do curauá soluções tampão para que se obtivessem os pHs desejados, que foram: 4,5; 5,5; 6,5; 7,5; 8,5; e 9,5.

Com isso, o mesmo procedimento adotado para a retirada das amostras para análise no caso da determinação da temperatura ótima foi seguido para o pH ótimo.

3 Resultados e discussões

As enzimas possuem um pH ótimo, sendo a distribuição das cargas ideal para a catálise; acima desse pH ótimo a atividade enzimática diminui,

visto que a enzima começa a perder sua função até tornar-se inativa.

Esses dados são de extrema importância na estratégia de purificação da enzima bromelina e sua aplicação industrial, evitando a perda de atividade pelo uso de faixas de pH agressivos às enzimas e a redução na eficiência do método empregado (SANTANA, 2006).

As Figuras 1 e 2 mostram o efeito do pH sobre a atividade da bromelina da folha do curauá nas variedades branco e roxo. Os resultados observados evidenciam que a atividade foi afetada na faixa de pH estudado. Observou-se que a máxima atividade ocorreu no pH 8,5 tanto para o curauá branco como para o roxo; indicando que esse é o pH ótimo para a bromelina das folhas de curauá. Entretanto, um pico de menor intensidade foi observado no pH 5,5, sugerindo que pode haver mais do que uma protease nas folhas de curauá.

Ferreira (2007), Ko et al. (1990), Rasheedi et al. (2003) e Rowan et al. (1990) encontraram maior atividade no pH 7,0 para a bromelina da casca e talo do abacaxi.

Na Figura 3, descreve-se o perfil da atividade da bromelina das folhas de curauá branco, em diferentes temperaturas. A atividade máxima foi observada em 30 °C. Outro pico foi observado em 10 °C.

A Figura 4 mostra o perfil da atividade da bromelina das folhas de curauá roxo, em diferentes temperaturas. Para essa variedade, os resultados mostraram três picos em que a atividade foi máxima (10 °C, 20 °C e 35 °C). A presença de dois ou mais picos decorrente da atividade elevada, corrobora os resultados do efeito do pH na atividade da enzima que indicava a presença de outras proteases nas folhas de curauá.

Rowan et al. (1990) caracterizaram a bromelina do talo do abacaxi, que apresentou atividade máxima a 60 °C. Ko et al. (1990) encontraram temperatura ótima de 62,5 °C. Khan et al. (2003)

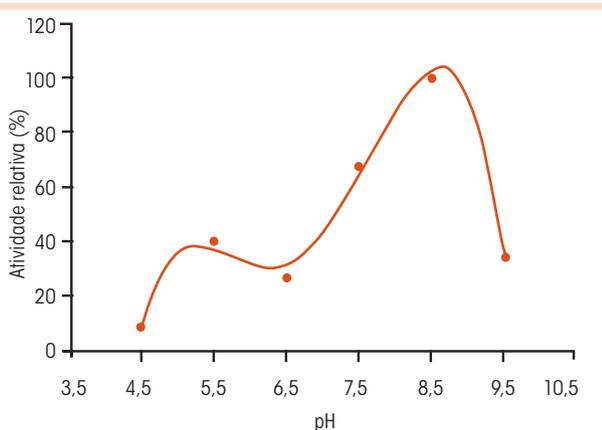


Figura 1: Efeito do pH sobre a atividade proteolítica da bromelina do curauá branco
 Fonte: os autores.

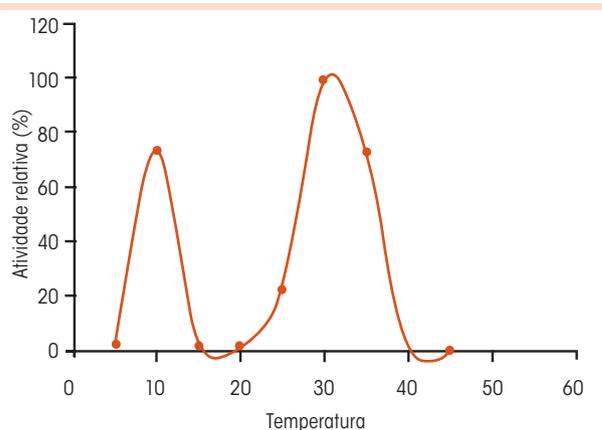


Figura 3: Efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica da bromelina do curauá branco
 Fonte: os autores.

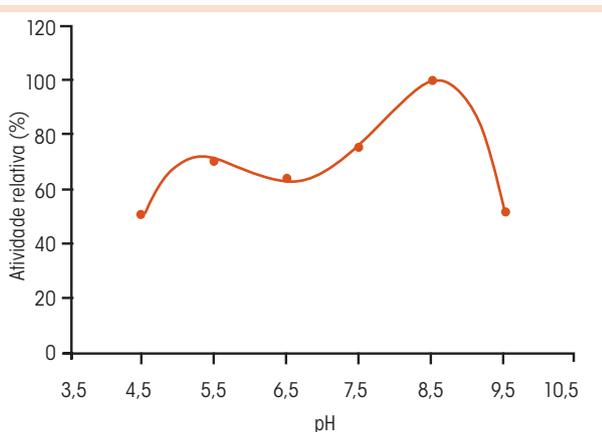


Figura 2: Efeito do pH sobre a atividade proteolítica da bromelina do curauá roxo
 Fonte: os autores.

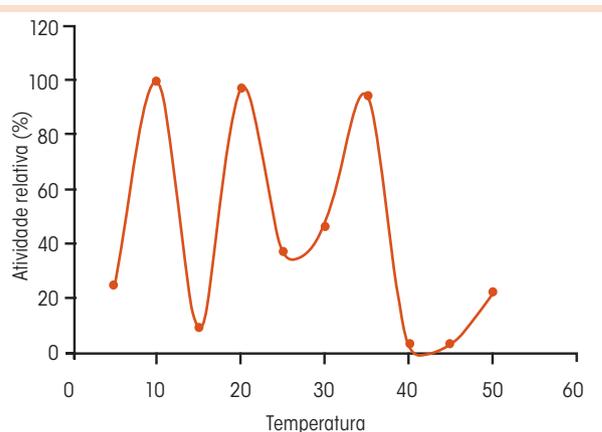


Figura 4: Efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica da bromelina do curauá roxo
 Fonte: os autores.

e Rasheedi et al. (2003) também caracterizaram a bromelina do talo e encontraram temperatura ótima de 37 °C. Ferreira (2007) observou que a faixa ideal de temperatura na caracterização da bromelina da casca e talo do abacaxi é entre 30 °C e 40 °C.

4 Conclusões

Na etapa de caracterização da enzima, determinaram-se o pH e a temperatura ótimos para sua utilização, fatores esses importantes na estra-

tégia de purificação da enzima bromelina, evitando a perda de atividade pelo uso de faixas de pH e temperatura agressivos às enzimas e a redução na eficiência do método empregado. Observou-se que o valor do pH ótimo da bromelina foi 8,5, em que ela apresentou o máximo de atividade. Na determinação da temperatura ótima de utilização da enzima, o valor observado foi 30 °C para a espécie de curauá branco, e três temperaturas ótimas foram observadas para o curauá roxo: 10 °C, 20 °C e 35°C.

A utilização da folha de curauá pela indústria poderia ser maximizada, extraindo-se não

apenas a fibra da planta, como ocorre atualmente, mas também enzimas proteolíticas de alto valor econômico, que são descartadas, diminuindo assim, o impacto ambiental e o desperdício de fontes interessantes para a indústria farmacêutica.

Referências

- BALDINI, V. L. S.; IADEROZA, M.; FERREIRA, E. A. H.; SALES, A. M.; RAETTA, I. S.; GIACOMELLI, E. J. *Ocorrência da bromelina e cultivares do abacaxizeiro*. Colet. Ital, v. 23, n. 1, p. 44-55, 1993.
- CÉSAR, A. C. W.; SILVA, R.; LUCARINI, A. C. *Recuperação das enzimas proteolíticas presentes nas casca e talo do abacaxi*, p. 47-54, São Carlos, 1999.
- FERREIRA, J. F. *Caracterização e purificação da enzima bromelina em sistema de duas fases aquosas PEG/Fosfato*. Dissertação (mestrado)–UNICAMP, Campinas, 2007.
- HALPERN, M. J. *Bioquímica*. 1. ed. Lisboa: Lidel Edições Técnicas, 1997.
- KHAN, R. H.; RASHEEDI, S.; HAQ, S. K.; J. BIOSCI. *Effect of pH, Temperature and alcohols on the stability of glycosylated and deglycosylated stem bromelain enzymes*, 28, p. 709-714, 2003.
- KO, Y. H.; KANG, Y. J. *Isolation and partial characterization of proteolytic enzymes from stems of pineapples cultivated in Cheju Island*, Nonmunjip-Cheju Taehakkyo, Chayon Wahakpyon, 31, p. 137-142, 1990.
- MACHADO, I. S.; BERTOZZO, F.; MICHELINI, J.; CANTANHEDE, I. S. L.; SORIANO, L. Avaliação da atividade da enzima bromelina em resíduo agroindustrial de curauá (*Ananas Erectifolius* L. B. Smith). *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, v. 13, p. 1817 – 1820, 2007.
- MORITA, T; ASSUMPCÃO, R. M. V. (Eds.). *Manual de Soluções, Reagentes e Solventes. Padronização – Preparação – Purificação*. 2. ed., 9ª reimpressão, Edgard Blücher Ltda, São Paulo, SP, 1995, p. 276.
- MOTHÉ, C. G.; ARAUJO, C. R. Thermal and mechanical characterization of polyurethane composites with curaua fibers. *Polímeros*, v. 14, p. 274-278, 2004.
- OLIVEIRA, E. C. P.; LAMEIRA, O. A.; SOUSA, F. I. B.; SILVA, R. J. F. Estrutura foliar de curauá em diferentes intensidades de radiação fotossinteticamente ativa. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, v. 43, n. 2, p. 163-169, 2008.
- PIRES, J. S. C.; LEÃO, A. L. Avaliação de príncípios ativos em culturas fibrosas. *16º SIICUSP – Simpósio Internacional de Iniciação Científica*, 2008.
- RASHEEDI, S.; HAQ, S. K.; KHAN, R. H. Guanidine hydrochloride denaturation of glycosylated and deglycosylated stem bromelain. *Biochemistry*, v. 68, p. 1097-1100, 2003.
- RICARDO, C. P.; TEIXEIRA, A. *Enzimas*. Lisboa, Portugal: Ed. Plátano, 1993.
- RIEGEL, R. E. *Bioquímica*. 3. ed. São Leopoldo: Edunisinos, 2003.
- ROWAN, A. D.; BUTTLE, D. J.; Barrett, A. J. The cysteine proteinases of the pineapple plant. *Biochemical Journal*, v. 266, n. 3, p. 869-875, 1990.
- SANTANA J. C. C. *Caracterização e recuperação das enzimas e – amilases por sistema de adsorção em leito expandido*. Tese (doutorado)–UNICAMP, Campinas, 2006.
- ZANCAN, G. T. (Org). *Bioquímica – aulas práticas*, 6. ed. Curitiba: UFPR, 2005.

Recebido em 16 nov. 2009 / aprovado em 28 jun. 2010

Para referenciar este texto

FERREIRA, J. F. et al. Extração e caracterização de uma enzima proteolítica do curauá (*Ananas Erectifolius*). *Exacta*, São Paulo, v. 8, n. 2, p. 179-184, 2010.