

Purificação de bromelina dos resíduos de abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill) por sistemas bifásicos aquosos PEG/Sal

*Bromelain purification from pineapple (*Ananas comosus* L. Merrill) wastes through PEG/Salt aqueous two-phase systems*

Diego de Freitas Coelho

Químico Industrial, Mestrando em Engenharia Química,
Departamento de Engenharia de Sistemas Químicos e
Informática – Faculdade de Engenharia Química,
Universidade Estadual de Campinas,
Campinas, SP [Brasil]
dfcoelho@live.com

Paulo A. G. Soares

Biomédico, Mestrando em Bioquímica e Fisiologia,
Departamento de Bioquímica, Universidade
Federal de Pernambuco,
São Paulo, SP [Brasil]
pags_18@hotmail.com

Edgar Silveira

Biólogo, Pós-Doutorando, Faculdade de Ciências
Farmacêuticas, Universidade de São Paulo
São Paulo – SP [Brasil]
silveiraedgar@gmail.com

Adalberto Pessoa Júnior

Engenheiro de Alimentos, Doutor – Faculdade de Ciências
Farmacêuticas Universidade de São Paulo
São Paulo, SP [Brasil]
pessoajr@usp.br

Elias Basile Tambourgi

Engenheiro Químico, Doutor – Departamento de Engenharia
de Sistemas Químicos e Informática - Faculdade de Engenharia
Química, Universidade Estadual de Campinas
Campinas, SP [Brasil]
eliastam@feq.unicamp.br

Resumo

Devido à dimensão da produção mundial de abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill) e ao grande percentual de resíduos gerados em seu cultivo e processamento, várias pesquisas têm sido realizadas para a recuperação das enzimas presentes no abacaxi, como a bromelina. Bromelina é o nome genérico dado ao conjunto de endopeptidases oriundas dos membros pertencentes à família Bromeliaceae, à qual pertence o abacaxi. Devido aos importantes papéis fisiológicos que desempenham, essas enzimas oferecem um amplo espectro de aplicações terapêuticas comprovadas. Este trabalho visa à purificação da bromelina a partir dos resíduos do abacaxi pelos Sistemas Bifásicos Aquosos (SBA) PEG/Sal, utilizando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CaCl_2 e fosfato de potássio. Os resultados referentes ao sistema PEG/ CaCl_2 mostraram que, na faixa utilizada de seus constituintes, não há separação de fases. Contudo, os sistemas PEG/Fosfato e PEG/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ apresentaram excelentes resultados, recuperando a bromelina com fator de purificação de 7,4 e 10,7 vezes, respectivamente, e rendimentos acima de 80%.

Palavras-chave: Bromelina. Purificação de proteínas. Sistemas bifásicos aquosos. Sulfato de amônio.

Abstract

Due to the dimension of worldwide production of pineapple and to high amount of generated waste from its cultivation and processing, several research have been developed to recovery the enzymes presents on pineapple, such as bromelain. Bromelain is the general name given to the group of endopeptidases found in pineapple as well as all proteases derived from members of the family Bromeliaceae, which belongs to the pineapple. Because of that play important physiological roles, these enzymes offers a wide range of proven therapeutic applications. This work aims the purification of bromelain from pineapple waste through PEG/Salt aqueous two-phase systems (ATPS) using $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CaCl_2 and potassium phosphate. The results showed that in CaCl_2 experiments have no ATPS formation in the range of its constituents. However, the PEG/phosphate systems and PEG/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ systems showed excellent results, recovering with bromelain purification factor of 7.4 and 10.7 times, respectively, and yields above 80%.

Key words: Ammonium sulphate. Aqueous two-phase system. Bromelain. Protein Purification.



1 Introdução

O abacaxi (*Ananas comosus* L.), originário das Américas, é cultivado na Ásia, na África, nas Américas (Norte, Central e Sul) e na Europa, sendo seu fruto consumido tanto na forma fresca como industrializada. O Brasil, um dos líderes mundiais em sua produção, cultiva mais de 60.000 hectares de abacaxi (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2009).

O grande percentual de resíduos gerados durante a usinagem, cerca de 60% do peso total do fruto, contém quantidades apreciáveis de bromelina, uma protease com numerosas aplicações nas indústrias alimentícias e farmacêuticas, que possui alto valor agregado e que, diferentemente da papaína, não desaparece quando o fruto amadurece (SRIWATANAPONGSE et al., 2000), gerando assim um número crescente de estudos de processos para sua recuperação e purificação.

Bromelina é o nome genérico dado ao conjunto de endopeptidases encontradas no abacaxi e, na verdade, a todas as proteases oriundas dos membros pertencentes à família Bromeliaceae (KENNEDY; TURAN, 1999).

Seguindo essa definição, essas enzimas foram nomeadas com números sistemáticos IUDMB: EC 3.4.22.32 e EC 3.4.22.33, para a bromelina do talo e fruto, respectivamente (KENNEDY; TURAN, 1999).

Essas enzimas oferecem um amplo espectro de aplicações terapêuticas comprovadas, demonstrando, *in vitro* e *in vivo*, atividades anti-inflamatórias, antitrombóticas e fibrinolíticas (MAURER, 2001), dando origem a medicamentos para o tratamento oral sistêmico de doenças inflamatórias e para doenças relacionadas à coagulação sanguínea.

Atualmente, a bromelina é preparada por meio da ultrafiltração, centrifugação e liofilização do suco refrigerado de abacaxi. Esse processo gera

um pó amarelado com 40% de teor de proteína (LAROCCA et al., 2010).

As vantagens dos Sistemas Bifásicos Aquosos (SBA) são bem conhecidas e incluem, entre outras, biocompatibilidade, alta área de contato interfacial e simplicidade de operação dos processos. Desse modo, neste estudo, descreve-se, comparativamente aos demais sais, a alta adequabilidade do sulfato de amônio como componente em sistemas bifásicos aquosos, constituindo um processo alternativo de purificação da bromelina. Para tal, utilizar-se-á planejamento fatorial para avaliar a influência das variáveis no fator de purificação e rendimento do processo.

2 Material e métodos

2.1 Extrato enzimático

O extrato enzimático foi obtido a partir da casca, do talo e das folhas do abacaxi (*Ananas comosus*), sendo esses resíduos coletados em supermercados locais. O material recolhido foi então triturado em processador de alimentos à temperatura ambiente (25 ± 3 °C), duplamente filtrado em tela de nylon (120 mesh), para retirada de fibras e particulados em suspensão, e posteriormente centrifugados a 2000 g, por 20 minutos, a 4 °C, para remoção do material insolúvel. O sobrenadante (extrato bruto) seguiu para a realização dos ensaios posteriores.

2.2 Determinação de proteínas totais e atividade enzimática

A concentração total de proteínas foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976). O ensaio de atividade enzimática foi realizado pelo método da azocaseína, como descrito por Oliveira et al. (2006), em que azocaseína 1,0% (p/v) (Sigma) foi solubilizada em 4% de etanol (v/v) e tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, e utilizados

como substrato. A mistura de ensaio, contendo 125 μL de substrato e 125 μL de extrato enzimático foi incubada por 10 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$, sendo a reação interrompida pela adição de 750 μL de ácido tricloroacético 5% (p/v).

As amostras foram então centrifugadas a 4000 g por 10 minutos e a uma temperatura de 5 $^{\circ}\text{C}$. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima requerida para produzir o aumento na densidade ótica em uma unidade no intervalo de uma hora.

A atividade específica foi calculada pela razão entre a atividade proteolítica total e a concentração total de proteínas da amostra. Seus resultados, então, são expressos em unidades de atividade por miligrama de proteína ($U \cdot \text{mg}^{-1}$).

2.3 Rendimento e fator de purificação

A fração de proteínas totais ($Y_S P$) para a fase superior foi calculado por meio da equação 1, que relaciona os volumes das fases às suas concentrações proteicas.

$$Y_S P = \frac{100}{\left(1 + \frac{V_I [P_T]_S}{V_S [P_T]_I}\right)} \quad (1)$$

Sendo V o volume, P_T a concentração total de proteínas. Os subscritos S e I referem-se às fases cujas variáveis representam: superior ou inferior, respectivamente. O cálculo da fração de bromelina particionada ($Y_S B$) foi, então, adaptado da equação 1. Assim:

$$Y_S B = \frac{100}{\left(1 + \frac{[M_{PT}]_I AE_S}{[M_{PT}]_S AE_I}\right)} \quad (2)$$

em que M_{PT} é a massa total de proteínas estimada na fase indicada pelo respectivo subscrito e a ati-

vide específica (AE). Os subscritos S e I referem-se às fases cujas variáveis representam: superior ou inferior, respectivamente. O fator de purificação foi calculado pela razão entre a atividade na fração de bromelina purificada e a atividade na fração total de proteínas (extrato bruto), como pode ser visto na equação 3.

$$F_P = \frac{AE_P}{AE_T} \quad (3)$$

2.4 Planejamento experimental e reparo dos sistemas bifásicos aquosos

Para delinear as condições de processo dos SBAs PEG/ CaCl_2 e PEG/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, utilizou-se um planejamento experimental fatorial, cujas variáveis estudadas foram: concentração do sal, massa molar do PEG e concentração do PEG (BARROS NETO et al., 2010). Para o sistema PEG/Fosfato, acrescentou-se ao planejamento o pH como variável estudada. Em todos os casos, o fator de purificação (F_P) foi escolhido como variável resposta. A Tabela 1 apresenta os níveis das variáveis independentes reais e codificadas.

Os sistemas, com massa total individual de cinco gramas (Sal + PEG + 1g de extrato + água), foram elaborados conforme o planejamento. Após a adição dos componentes, os sistemas foram agitados vigorosamente em vórtex por 180 segundos;

Tabela 1: Planejamento experimental fatorial completo 2⁴, para o fosfato, e 2³ para os demais sais

Variáveis	PEG/Fosfato				PEG/ CaCl_2 ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		
	pH	[Sal]	[PEG]	MM-PEG	[Sal]	[PEG]	MM-PEG
Nível -1	6	13%	15%	2000	15%	15%	2000
Nível 0 (P_0)	7	14%	17,5%	4000	20%	17,5%	4000
Nível 1	8	15%	20%	6000	25%	20%	6000

Concentrações percentuais dadas em m/m.

centrifugados a 3000 g, por 10 minutos, e tiveram alíquotas retiradas das fases formadas para realização das análises. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, bem como as análises que sucederam a separação das fases dos SBAs.

3 Resultados e discussões

A tentativa de utilização de CaCl_2 neste trabalho se baseou nos estudos realizados por Biazus et al. (2007). Contudo, os experimentos demonstraram que não há separação de fases, na faixa de constituintes utilizada, nos sistemas PEG/ CaCl_2 . Os sistemas PEG/Fosfato na faixa de pH trabalhada e à temperatura ambiente foram escolhidos baseados em Ferreira (2007). Nessa faixa de pH, a atividade proteolítica da enzima encontra-se em seu máximo (FERREIRA et al., 2011). Segundo Klomklao et al. (2005), o vasto número de estudos realizados em sistemas PEG/Sal, cujo diferencial consiste no aprimoramento da partição da molécula alvo pelo sal, mostrou que, após a separação das fases, a bromelina é particionada proeminentemente para a fase polimérica, principalmente em sistemas cuja característica hidrofóbica se assemelha às enzimas. Nesses sistemas, o particionamento de biomolécula depende, dentre outros fatores, do efeito do volume de exclusão do polímero na fase polimérica e do *salting-out* na fase rica em sal (BABU et al., 2008).

Os resultados dos estudos com o sistema PEG/Fosfato (ver Tabela 2) mostram que o experimento com maior valor para o fator de purificação foi aquele cuja composição era: 15% para o fosfato, 15% para o PEG, 2000 MMPEG e pH 8. Nessas condições, foi obtido rendimento de 89,9% e fator de purificação de 8,5 vezes.

Esses resultados, muito embora sejam inferiores aos encontrados por Ferrari et al. (2011),

Tabela 2: Resultados da purificação do sistema PEG/Fosfat

Experimento	pH	[Sais]	[PEG]	PM-PEG	Fp	Y _s B
1	-1	1	-1	1	0,73	37,59
2	-1	-1	-1	1	0,96	62,37
3	-1	-1	-1	-1	1,81	76,56
4	1	1	-1	1	7,70	88,21
5	1	-1	1	-1	5,80	97,12
6	-1	-1	1	1	0,67	46,20
7	1	1	1	-1	4,97	83,35
8	-1	1	1	-1	0,75	45,72
9	-1	1	-1	-1	0,96	50,21
10	1	1	1	1	7,76	97,91
11	-1	1	1	1	0,48	41,13
12	1	1	-1	-1	8,50	89,89
13	1	-1	-1	1	1,64	56,13
14	1	-1	-1	-1	3,12	76,46
15	-1	-1	1	-1	0,70	51,92
16	1	-1	1	1	2,86	83,40
17	0	0	0	0	2,05	69,65
18	0	0	0	0	2,11	67,58
19	0	0	0	0	2,06	69,81

refletem as condições experimentais utilizadas e são válidos para este estudo comparativo.

A Tabela 3 mostra os resultados obtidos para a purificação da bromelina utilizando o sulfato de amônio. Observa-se, então, que os resultados obtidos para o fator de purificação foram superiores àqueles obtidos, concentrando em aproximadamente 10 vezes a molécula alvo em seu ponto ótimo (MMPEG de 4000, [PEG] de 17,5% e $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ de 20%).

Tabela 3: Resultados da purificação da bromelina por sistemas bifásicos aquosos PEG/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Experimentos	MM-PEG	[PEG]	$[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$	Fp	Y _s B
1	-1	-1	-1	1,00	50,00
2	1	-1	-1	2,74	86,48
3	-1	1	-1	1,74	75,07
4	1	1	-1	2,30	84,15
5	-1	-1	1	8,00	83,17
6	1	-1	1	8,70	87,90
7	-1	1	1	4,91	84,08
8	1	1	1	4,51	85,64
9	0	0	0	10,57	88,27
10	0	0	0	10,78	88,24
11	0	0	0	10,76	87,86

A Figura 1 apresenta os dados dos fatores de purificação (F_p) e as frações de proteínas totais (Y_{5P}) e de bromelina particionadas para a fase superior (Y_{5B}) para ambos os sistemas formados com sucesso.

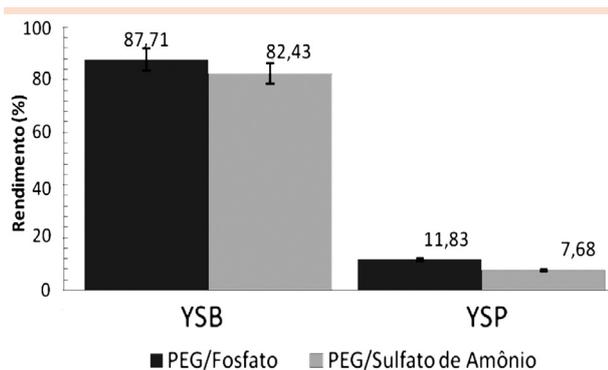


Figura 1: Fator de purificação, fração de proteínas totais e de bromelina para os sistemas PEG/Fosfato e PEG/(NH₄)₂SO₄ em suas respectivas condições ótimas

Tais dados mostram que o sistema PEG/Fosfato recuperou uma maior fração de bromelina, particionando a mesma para a fase rica em PEG, juntamente com a maior parte das proteínas. Entretanto, analisando-se o fator de purificação vê-se claramente que o sal mais adequado ao processo é o sulfato de amônio.

Soares et al. (2011) alcançou, em uma única etapa, 44% de rendimento na recuperação de bromelina a partir de resíduos de abacaxi, aumentando em quatro vezes a atividade específica. Hebbar et al. (2008), utilizando sistemas com micelas reversas, obtiveram 106% de recuperação da atividade enzimática e um fator de purificação de 5,2 vezes.

O principal objetivo de técnicas de baixa resolução como os sistemas aquosos bifásicos é concentrar a molécula alvo. Contudo, a manipulação dos parâmetros dos sistemas estudados pode aumentar a seletividade da partição e purificar consideravelmente a bromelina, possibilitando a redução de etapas no processo de obtenção da mesma.

4 Conclusões

Observou-se que o emprego do cloreto de cálcio é inadequado, pois não leva à formação de um sistema bifásico. Os sistemas PEG/Fosfato mostraram-se bastante eficientes, atingindo rendimento acima de 80% e fator de purificação de 8,5 vezes. No entanto, os melhores resultados para a purificação da bromelina foram obtidos por SBAs PEG/(NH₄)₂SO₄, alcançando um fator de purificação de 10,7 vezes no sistema PEG4000 (20%) – (NH₄)₂SO₄ (25%), demonstrando que houve uma concentração seletiva da molécula alvo na fase polimérica desse sistema.

Referências

- BABU, R. B.; RASTOGI, N. K.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. *Liquid-liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system*. Amsterdam, PAYS-BAS: Elsevier, 2008. 7.
- BARROS NETO, B. D.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, E. *Como Fazer Experimentos – Aplicações na Ciência e na Indústria*. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010. 414 ISBN 9788577806522.
- BIAZUS, J. P. M. et al. Continuous extraction of [alpha]- and [beta]-amylases from *Zea mays* malt in a PEG4000/CaCl₂ ATPS. *Journal of Chromatography B*, v. 858, n. 1-2, p. 227-233, 2007. ISSN 1570-0232.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. ISSN 0003-2697.
- FERREIRA, J. F. *Caracterização e purificação da enzima bromelina em sistema de duas fases aquosas PEG/Fosfato*. 2007. 97. Dissertação (Mestrado)– Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- FERREIRA, J. F.; SANTANA, J. C. C.; TAMBOURGI, E. B. The effect of pH on bromelain partition from *Ananas comosus* by PEG4000/phosphate ATPS. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 54, p. 125-132, 2011. ISSN 1516-8913.

HEBBAR, H. U.; 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, n. 11, p. 4896-4902, 2008. ISSN 0960-8524.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Produção Agrícola Municipal – PAM. Rio de Janeiro: IBGE, p. 93. 2009. (0101-3963)

KENNEDY, J.; TURAN, N. Handbook of Proteolytic Enzymes, Alan J. Barrett, Neil D. Rawlings & J. Fred Woessner (Eds.), Academic Press, 1998, p. xxx + 1666. ISBN: 0-12-079370-9. In: Bioseparation, *Springer*, v. 8, n. 6, p. 340-341, 1999.

KLOMKLAO, S. et al. Partitioning and recovery of proteinase from tuna spleen by aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 9, p. 3061-3067, 2005. ISSN 1359-5113.

LAROCCA, M. et al. Analysis of pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.] fruit proteinases by 2-D zymography and direct identification of the major zymographic spots by mass spectrometry. *Food Chemistry*, v. 123, n. 4, p. 1334-1342, 2010. ISSN 0308-8146.

MAURER, H. R. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 58, n. 9, p. 1234-1245, 2001. ISSN 1420-682X.

OLIVEIRA, L. A.; PORTO, A. L. F.; TAMBOURGI, E. B. Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes. *Bioresource Technology*, v. 97, n. 6, p. 862-867, 2006. ISSN 0960-8524.

SOARES, P. et al. Studies on Bromelain Precipitation by Ethanol, Poly(Ethylene Glycol) and Ammonium Sulphate. *Chemical Engineering Transactions*, v. 24, p. 5, 2011. ISSN 1974-9791.

SRIWATANAPONGSE, A.; BALABAN, M.; TEIXEIRA, A. *Thermal inactivation kinetics of bromelain in pineapple juice*. St. Joseph, MI, ETATS-UNIS: American Society of Agricultural Engineers, 2000.

Recebido em 10 nov. 2011 / aprovado em 13 dez. 2011

Para referenciar este texto

COELHO, D. F. et al. Purificação de bromelina dos resíduos de abacaxi (*Ananas comosus* L. Merril) por sistemas bifásicos aquosos PEG/Sal. *Exacta*, São Paulo, v. 9, n. 3, p. 333-338, 2011.