

Estudo da Estabilidade da Enzima Bromelina Extraída do Curauá roxo (*Ananas erectifolius*)

T. A. L. Silva¹ & E. B. Tambourgi²

¹ Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Engenharia Química, 13083-852 - Campinas - SP - Brasil

² Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química

silva_tal@yahoo.com.br

(Recebido em 09 de novembro de 2010; aceito em 31 de janeiro de 2011)

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade da enzima bromelina extraída das folhas do curauá *Ananas erectifolius*, cultivar roxa, e estudar a estabilidade dessa enzima largamente utilizada nas indústrias farmacêuticas e de alimentos. A atividade proteolítica foi medida para cada um dos ensaios pelo método do Biureto, determinando-se a temperatura e pH ótimos de sua utilização. O estudo da estabilidade foi realizado variando o pH na faixa de 4 a 8 e temperaturas de 10°C e 25°C, de acordo com o tempo. Os resultados demonstraram que a bromelina apresentou melhor estabilidade nas condições de pH 8 a 10°C até o período de 48 horas.

Palavras-chave: curauá; bromelina; estabilidade

This study aimed to evaluate the activity of the enzyme bromelain extracted from the leaves of curauá *Ananas erectifolius* purple variety, and to study the stability of this enzyme widely used in the pharmaceutical and food industries. The proteolytic activity was measured for each of the tests by the Biuret method, determining the optimum temperature and pH for its use. The stability study was conducted by varying the pH in the range 4 to 8 and temperatures of 10°C and 25°C, according to the time. Results showed that bromelain showed better stability under the conditions of pH 8 at 10°C up to 48 hours of incubation.

Key-words: curaua; bromelain; Stability

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 [1].

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 [2]. 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 (*Ananas comosus* var. *erectifolius* [3,4]. No Brasil e no exterior, a fibra de curauá é submetida a freqüentes pesquisas, que vêm apresentando resultados significativos, o que torna essa espécie a mais promissora entre as espécies produzidas na Amazônia brasileira [1].

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 através da maximização de todas as propriedades destas.

Como toda planta da família *Bromeliaceae*, o curauá apresenta como constituinte a enzima bromelina; de alto valor comercial e com ampla aplicação na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética. A bromelina é uma enzima 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 que a bromelina se enquadra neste último grupo [5]. A bromelina tem diversos usos, todos baseados em sua atividade proteolítica. A 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, 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 [6].

Um dos grandes desafios na obtenção da bromelina é manter a sua estabilidade enzimática durante o processo de extração, purificação, secagem e estocagem. Por isso, estudos vêm sendo conduzidos para identificar os mecanismos que levam à desnaturação da proteína, e com isso, apontar formas de minimizar esta inativação [7]. Desta forma, a determinação da atividade da enzima em plantas de curauá poderá proporcionar indicativos para posterior purificação e, desta forma, contribuir para a otimização do uso desta espécie, uma vez que o principal produto de extração é a fibra, sendo que os demais componentes são, atualmente, descartados.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a estabilidade da bromelina extraída do curauá em diferentes condições de temperatura e pH.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

As folhas do curauá foram lavadas com água destilada, secas em papel toalha e armazenadas em sacos plásticos, sob refrigeração, até a utilização da mesma.

Foram pesadas na proporção 1:2 de solução tampão no pH desejado e folhas de curauá da variedade roxa. Em seguida, estes foram triturados em um multiprocessador de alta eficiência e filtrados em tela de Nylon para retirada de fibras e particulados presentes no extrato.

Para a determinação da atividade enzimática da bromelina, utilizou-se o método do biureto. As análises foram realizadas em triplicata a partir das amostras preparadas das folhas.

As amostras foram submetidas a duas condições de temperatura e três variações de pH. Para estudar o efeito do pH foram utilizadas soluções-tampão (pH 4, 7 e 8) e para estudar o efeito da temperatura, as amostras foram incubadas a 10°C e 25°C, por um período de 48 horas. Foi medida a atividade no tempo zero e após 10 minutos em cada condição de temperatura e pH. O preparo das amostras e a determinação da atividade enzimática foram realizados de acordo com o seguinte procedimento: Utilizou-se uma leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda igual a 540 nm, em virtude do complexo formado entre as proteínas e o reagente do biureto absorver nesta região.

A albumina foi utilizada como substrato a ser hidrolisado pela enzima bromelina, em uma proporção de enzima e proteína de 1:5, como segue: Colocou-se 5 mL de BSA (Albumina de Soro Bovina) em um tubo, adicionou-se 1 mL da enzima (extrato das folhas de curauá) para cada pH em estudo.

Em seguida, o tubo foi agitado no agitador magnético e foi retirada uma amostra que corresponde ao tempo zero (tempo inicial). Logo após, esta amostra foi colocada em outro tubo e adicionou-se 5 mL do biureto, imediatamente.

Depois de retirada a amostra, deixou-se a amostra inicial reagir por 10 minutos e após esse período retirou-se outra amostra e seguiu-se o mesmo procedimento anterior.

As amostras foram deixadas em descanso por 10 minutos para estabilizar e em seguida foram lidas em espectrofotômetro.

Para o cálculo da atividade enzimática foi utilizada a Equação 1,

$$AE = \frac{V_{\text{Reator}}(\text{Litros}) * 10^6(\mu\text{mol/mL})}{MM_{\text{BSA}} * V_{\text{Enzima}}(\text{mL}) * t_{\text{reação}}(\text{min})} \quad (1)$$

Onde A_E é a atividade enzimática, MM_{BSA} é a massa molar do substrato utilizado, no caso, a albumina de soro bovina - BSA, V_{Enzima} corresponde ao volume da amostra e $t_{reação}$ é o tempo para degradação da proteína [8,9].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, a estabilidade da atividade da bromelina extraída das folhas do curauá, var. roxa foram testadas em duas condições de temperatura (10°C e 25 °C), combinadas a três variações de pH (4, 7 e 8), incubadas por um período de 48 horas.

A temperatura de armazenamento ou de exposição de uma enzima é um fator de extrema importância para a manutenção de sua atividade catalítica, já que o calor é um agente desnaturante [10]. Baseando-se nesta possibilidade, a atividade proteolítica da enzima bromelina foi testada em diferentes temperaturas e valores de pH.

Na Figura 1, condição na temperatura de 10°C, pode-se notar um decréscimo inicial da atividade enzimática entre os valores de pH 4 e 7, e em seguida, um leve aumento na taxa de atividade seguida por um decréscimo praticamente constante.

Na condição de pH 8, pode-se observar uma relativa estabilidade na taxa de atividade da bromelina, atingindo valores em torno de 12 U/mL.

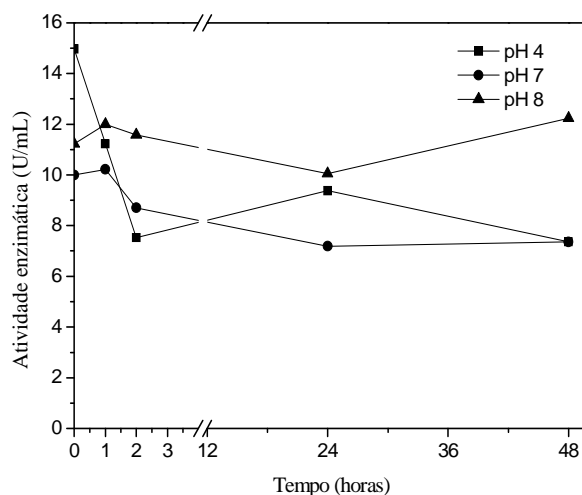


Figura 1 - Estabilidade da atividade da bromelina durante as 48 horas, na temperatura de 10°C, (pH 4, 7 e 8).

Na Figura 2, condição na temperatura de 25°C, pode-se observar um decréscimo constante na taxa de atividade da enzima entre os valores de pH 7 e 8, em que ela apresenta-se praticamente desnaturada. Na condição de pH 4, há um decréscimo inicial na atividade, seguida por um leve aumento e estabilidade praticamente constante.

A bromelina das folhas do curauá apresentou melhor perfil de atividade e estabilidade em pH 8 a 10°C e pH 4 a 25°C.

Esse resultado difere, por exemplo, de uma caracterização da bromelina em que o pH ótimo encontrado foi 7,5, para o *Ananas cosmosus* [11].

Porém notou-se que nesta faixa de pH, em ambas condições de temperatura, não houve elevação da atividade enzimática. Silva et al.,(2006) [12] encontraram valores ótimos de estabilidade da atividade enzimática nas temperaturas entre 25°C e 40°C, e pH entre 5,5 e 8,0.

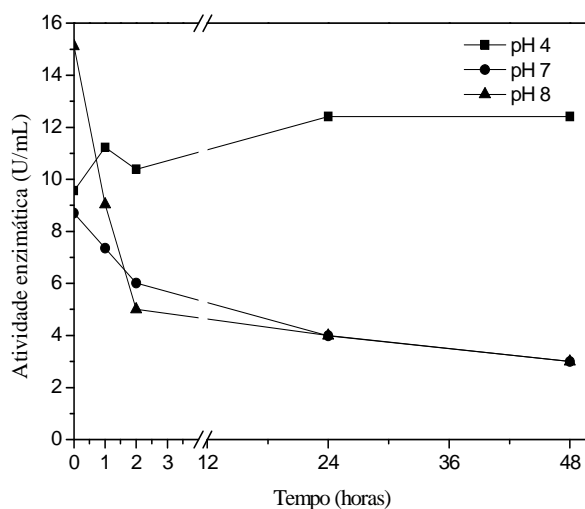


Figura 2 - Estabilidade da atividade da bromelina durante as 48 horas, na temperatura de 25°C, (pH 4, 7 e 8).

O pH ótimo de atividade é influenciado pela natureza do substrato, pela concentração e tipo de solução tampão utilizada e também pela presença de agentes redutores. Para auxiliar na classificação dessas enzimas, as proteases são designadas pelo pH ótimo de atividade.

Portanto, para determinadas proteases também presentes no extrato bruto podemos encontrar atividade em determinadas faixas de pH como demonstrado neste estudo.

Assim como o pH, a temperatura pode ser um fator de desnaturação protéica e conseqüentemente de perda da atividade enzimática.

4. CONCLUSÃO

A bromelina apresentou um melhor perfil de estabilidade na condição de pH 8 a 10°C, porém mostrou atividade em todos os valores de pH, confirmando ser um complexo enzimático com atividade hidrolítica.

- 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. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v.43, n.2, p.163-169, 2008.
- MOTHE, C. G.; ARAUJO, C. R. Thermal and mechanical characterization of polyurethane composites with curaua fibers. *Polímeros*, v.14, p.274-278, 2004.
- COPPENS d'EECKENBRUGGE, G.; LEAL, F. Morphology, anatomy and taxonomy. In: BARTHOLOMEW, D. P.; PAULL, R. E.; ROHRBACH, K. G. *The pineapple: botany, production and uses*. New York: CAB International, cap. 2, p. 13-32, 2003.
- SMITH, L. B. A new look at the species of pineapple. *Bromeliad Society Bulletin*, v. 12, p. 54-55, 1962.
- PIRES, J. S. C.; LEÃO, A. L. Avaliação de princípios ativos em culturas fibrosas. In: Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo, 16, 2008, São Paulo. Anais: *16 SIICUSP*. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2008. Resumo 5501
- BALDINI, V. L.; IADEROSA, M.; FERREIRA, E. A.; SALES, A. M.; DRAETTA, I. S.; GIACOMELLI, E. J. Ocorrência da bromelina em espécies e cultivares de abacaxizeiro. *Colet. ITAL*, Campinas, v. 23, p. 44-55, 1993
- CABRAL, A. C. S. Otimização de parâmetros para secagem de enzimas por spray dryer. Mestrado. Universidade de São Paulo/ Ribeirão Preto-Ciências Farmacêuticas, 1 v. 97 p., 2005.

-
8. MURACHI, T. Bromelain enzymes. In: *Methods in Enzymol.*, vol. XLV. New York: Ed. L. Lorand, Academic Press, p. 475-485, 1976.
 9. LOPES, F. L. G. Recuperação da bromelina a partir da polpa do Ananas comosus L-merril, utilizando processo de separação por membrana. 2005. 157 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
 10. FRANÇA-SANTOS, A.; ALVES, R. S.; LEITE, N. S.; FERNANDES, R. P. M. Estudos bioquímicos da enzima bromelina do *Ananas cosmosus* (abacaxi). *Sci. Plena*, v.5, n.11, p.1-6, 2009
 11. HARRACH, T.; ECKERT, K.; MAURER, H. R. Isolation and characterization of two forms of an acidic bromelain stem proteinase. *J. Prot. Chem.*, v.17, p. 350-361, 1998.
 12. SILVA, R. A.; CADENA, P. G.; LIMA FILHO, J. L.; PIMENTEL, M. C. B. O fármaco bromelina: estudos físico-químicos e cinéticos. In: Congresso Brasileiro de Química, 46, 2006, Salvador, Bahia. Anais: *XLVI Congresso Brasileiro de Química*, Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Química, 2006. Resumo 292.