

Otimização do processo de recuperação e concentração da bromelina utilizando membranas cerâmicas

G. A. Lima; M. F. Santana; R. R. Souza

Laboratório de Biotecnologia Ambiental (LABAM), Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000, São Cristóvão-SE, Brasil

glesyanne@gmail.com, rrsouza@ufs.br

(Recebido em 30 de outubro de 2009; aceito em 30 de novembro de 2009)

Os processos de separação por membranas apresentam uma alternativa técnica e economicamente atraente para recuperar e purificar proteínas. Estes processos demandam pouca energia, além de apresentarem grande especificidade na separação. Bromelina é uma enzima proteolítica que possui um alto valor medicinal. Sua ação inclui: inibição da agregação plaquetária, atividade fibrinolítica, ação antiinflamatória, ação antitumoral, aumento da absorção de outras drogas, facilitador da digestão, acelerador da cicatrização, etc. Tendo em vista a importância da enzima supracitada realizou-se a otimização do processo de recuperação e concentração da bromelina do abacaxi (*Ananas Comosus*) utilizando membranas cerâmicas.

Palavras chave: Bromelina, membranas, microfiltração

The processes of separation for membranes present an alternative technically and economically attractive to recover and purify proteins. These processes demand little energy, besides presenting great specificity in separation. Bromelain is a proteolytic enzyme that has a high medicinal value. Its action includes: inhibition of the platelet aggregation, fibrinolytic activity, anti-inflammatory, antitumoral, increased absorption of other drugs, facilitating digestion, healing accelerator, etc.. In view of the importance of the above-mentioned enzyme was held above the optimization of the recovery and concentration of bromelain from pineapple (*Ananas comosus*) using ceramic membranes.

Keywords: Bromelain, membranes, microfiltration

1. INTRODUÇÃO

Muitas técnicas têm sido utilizadas para recuperação e purificação de proteínas e enzimas de origem animal, vegetal ou microbiana. Técnicas mais antigas como a precipitação, extração com solventes e filtração geralmente tem alto poder de concentração e baixa purificação e técnicas mais modernas como a cromatografia de afinidade, troca iônica ou gel-filtração, eletroforese, extração em duas fases aquosas, extração com micela reversa, recuperam e purificam, muitas vezes até a homogeneidade [1].

Os processos de separação por membranas apresentam uma alternativa técnica e economicamente atraente para recuperar e purificar proteínas. A membrana controla a taxa de separação, fornece uma corrente de saída, pobre em certos componentes, e uma rica, nestes mesmos [2]. São processos que demandam pouca energia, além de apresentarem grande especificidade na separação. São relativamente simples e fáceis de serem operados e apresentam, entre outras vantagens, seletividade, separação de termolábeis e simplicidade de operação.

As membranas podem ser classificadas com base no tipo de substâncias separadas ou de acordo com o tipo de força empregada. Esta força é conhecida como força motriz, que confere a membrana diferente permeabilidade para os diferentes compostos. É esta característica que permite o uso de membranas semipermeáveis em processo de separação [3].

Os processos de separação com membranas que utilizam diferença de pressão através da membrana como força motriz tem sido utilizados para concentrar, fracionar e purificar soluções diluídas. Em função da natureza e do tipo de solutos e da presença ou não de partículas em suspensão, membranas com diferentes tamanhos e distribuição de poros ou mesmo densas são empregadas, caracterizando os processos conhecidos como microfiltração, ultrafiltração, osmose inversa e nanofiltração.

A bromelina é uma enzima proteolítica, presente nos vegetais da família bromeliácea, sendo o abacaxi, o fruto mais conhecido. Essa enzima possui um alto valor medicinal, sendo utilizado como digestivo e antiinflamatório além de ser utilizada na clarificação de cervejas, amaciamento de carnes, na fabricação de queijos, no preparo de alimentos infantis e dietéticos, no pré-tratamento de soja, no tratamento de distúrbio digestivos, feridas e inflamações, preparo do colágeno hidrolisado, redução de cólicas menstruais, etc.

A faixa de pH ótima para as enzimas bromelinas, é em torno de 6,0 a 9,0 com máximo de atividade no pH 7,0 [3]. A maioria das moléculas biológicas são muito estáveis no ambiente aquoso de pH neutro e temperatura moderada encontrado no interior das células. Muitas reações bioquímicas comuns envolvem eventos químicos que são muito improváveis nas condições de ambiente celular como a formação transiente intermediários eletricamente carregados e instáveis ou a colisão de duas ou mais moléculas com a orientação precisa e necessária para que ocorra a reação.[4]

Neste contexto, esse trabalho propõe a otimização do processo de recuperação e concentração da bromelina do abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill) utilizando membrana cerâmica, visando identificar as condições operacionais adequadas para a maior produção desta enzima com o máximo de atividade enzimática possível.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Ambiental (LABAM), pertencente ao Departamento de Engenharia Química (DEQ) da Universidade Federal de Sergipe (UFS). As amostras foram preparadas com abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill) do cultivar Pérola, comercializado nos supermercados da cidade de Aracaju-SE.

O suco concentrado da polpa do abacaxi maduro foi preparado em condições de pressão e temperatura ambiente, que foi inicialmente filtrado em camadas de algodão para retenção de sólidos dispersos, tamponado para adquirir o pH desejado e em seguida passado na membrana cerâmica de microfiltração com diâmetro de poro de 0,1 μ metro, e em seguida efetuou-se a ultrafiltração do suco permeado do processo anterior por uma segunda membrana com diâmetro de poro igual a 4 kDa.

A Figura 1 mostra o sistema de membrana cerâmica utilizado neste trabalho, que foi composto por um módulo de acrílico, dois manômetros, uma serpentina de cobre para resfriar o processo, e uma bomba centrífuga.

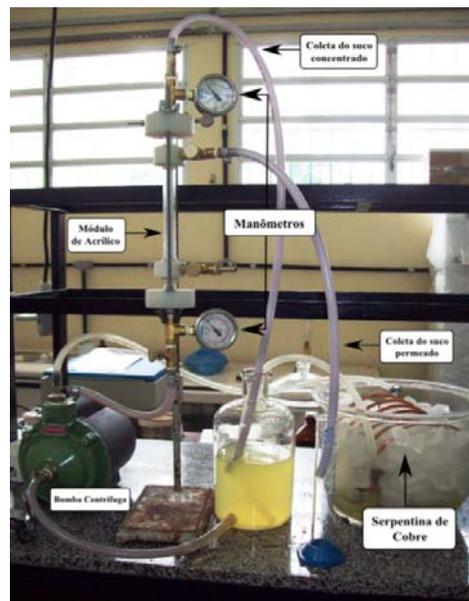


Figura 1: Sistema Operacional

A proteína total do concentrado e permeado foi determinada pelo método descrito por BRADFORD (1976). [5]

O procedimento de análise foi realizado da seguinte maneira: em um tubo de ensaio colocou-se entre 100 e 500 μ L da amostra (dependendo da concentração da proteína da amostra) e completou-se com água destilada até 1000 μ L. Acrescentou-se 1000 μ L do reagente, agitou-se o tubo no vórtice e realizou-se a leitura de absorvância a 595nm. As análises foram feitas em triplicata. O branco foi preparado com 1000 μ L de água destilada e 1000 μ L do reagente.

Para os cálculos da concentração de proteína, fez-se uma curva de calibração utilizando soluções de albumina de soro bovino (BSA) concentrações variando de 2,5 a 40mg/L.

A atividade enzimática foi realizada no suco extraído da polpa do abacaxi, após a passagem pelas membranas, baseada no método descrito por MURACHI (1976) e BALDINI (1993). [6] e [7] 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 utilizado (biureto) absorver nesta região. A albumina bovina foi utilizada como substrato a ser hidrolisado pela enzima bromelina.

As variáveis estudadas foram: pH, pressão transmembranar e velocidade superficial. Os valores das variáveis escolhidas foram selecionados de acordo com estudos realizados pelo Grupo de Pesquisa em Biotecnologia e Meio Ambiente (GPBIOMA) com as membranas tipo fibras ocas e planas, onde se concluiu que quanto menor a pressão, maior a recuperação da bromelina na microfiltração e consequentemente maior a concentração da enzima após a etapa de ultrafiltração. O planejamento experimental foi realizado, e partir deste fizemos uma análise preliminar sobre a utilização de membranas cerâmicas para obtenção da bromelina nas condições adotadas. Neste trabalho utilizou-se um planejamento fatorial completo 2^3 , com triplicata no ponto central; dois níveis e três variáveis, como mostra a tabela 1.

Tabela 1: Valores Reais Dos Níveis Para Cada Variável Estudada No Planejamento Experimental Fatorial Fracionário 2^3

Nível	Pressão transmembranar (bar)	pH	Vazão (mL/s)
+1	1,1	8,0	30
0	0,9	7,0	20
-1	0,7	6,0	10

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste tópico iremos apresentar os resultados referentes ao ponto central do planejamento, uma vez que estas condições apresentaram os melhores resultados para todas as variáveis estudadas.

A Figura 2 mostra o fluxo de permeado ao longo de todo processo de microfiltração, onde pode-se observar que o fluxo de permeado é constante durante 5 horas, após esse tempo a vazão de permeado começou a decair devido aos efeitos da polarização por concentração e do *foulling*, os quais provocam uma deposição sobre a superfície e o poro da membrana respectivamente, provocando o decaimento do fluxo, chegando ao ponto de inviabilizar a condução da operação.

Na Figura 3 observa-se que a proteína é transmitida do concentrado para o permeado atingindo um máximo em aproximadamente 4 horas de operação. Após esse tempo há uma diminuição da transferência de proteínas para o permeado. No entanto, à medida que o volume de concentrado se reduz, a concentração de proteínas totais no mesmo tende a aumentar. Este fato ocorre devido à adsorção das proteínas a superfície da membrana aumentando o *foulling* irreversível e contribuindo para o bloqueio, total ou parcial, dos poros o que impede a transferência da mesma para o permeado.

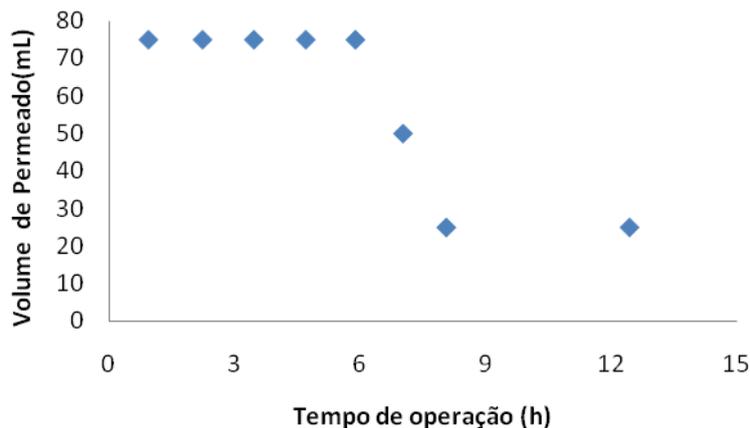


Figura 2: fluxo de permeado durante o processo de microfiltração.

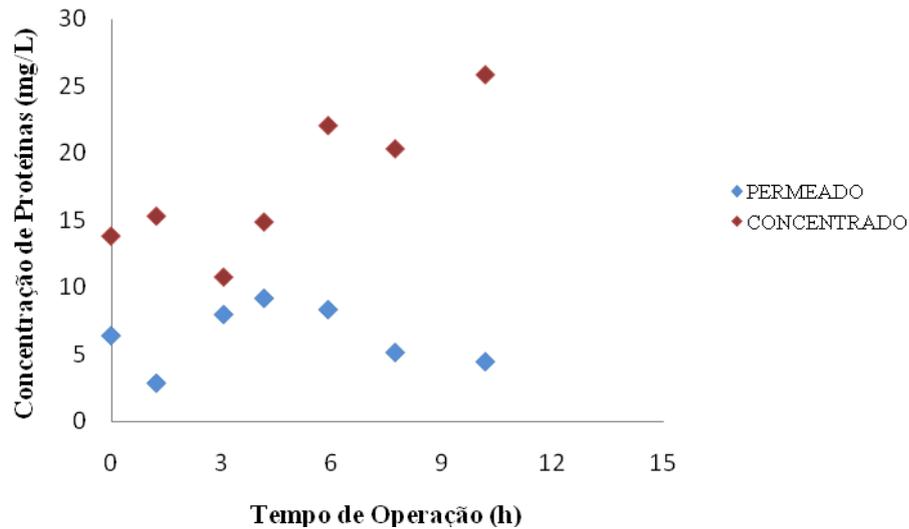


Figura 3: Concentração de proteínas totais na microfiltração.

Como pode-se observar na Figura 4, houve uma redução da atividade enzimática no permeado e um aumento no concentrado durante o processo de microfiltração. Além de fenômenos já citados como polarização por concentração e *fouling* que impedem a passagem de proteínas pelos poros da membrana, essa redução de atividade foi ocasionada pelo tempo de operação prolongado que contribuiu para a desnaturação da enzima a ser recuperada.

A atividade específica no concentrado foi muito baixa, chegando a valores próximos de zero, enquanto que no permeado esta atividade se mostra inicialmente crescente chegando a um máximo no permeado obtido ao final do processo (Figura 5).

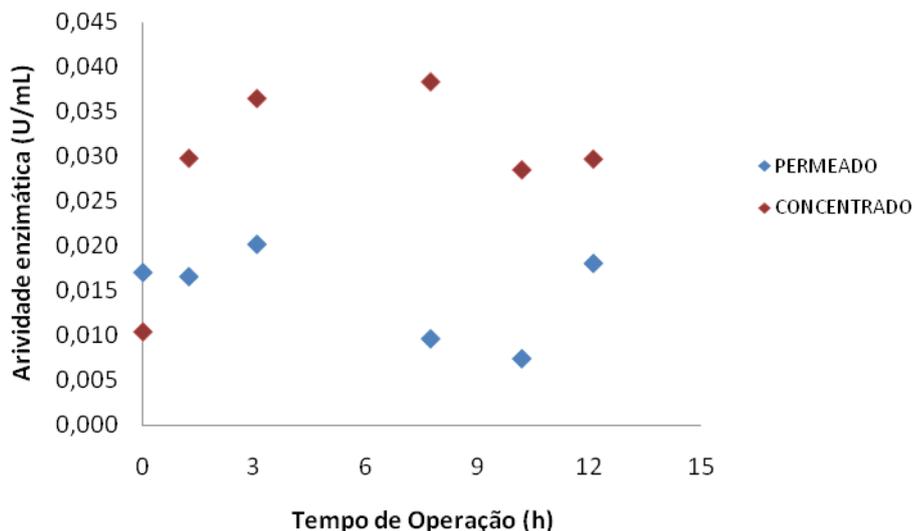


Figura 4: Atividade enzimática durante a microfiltração.

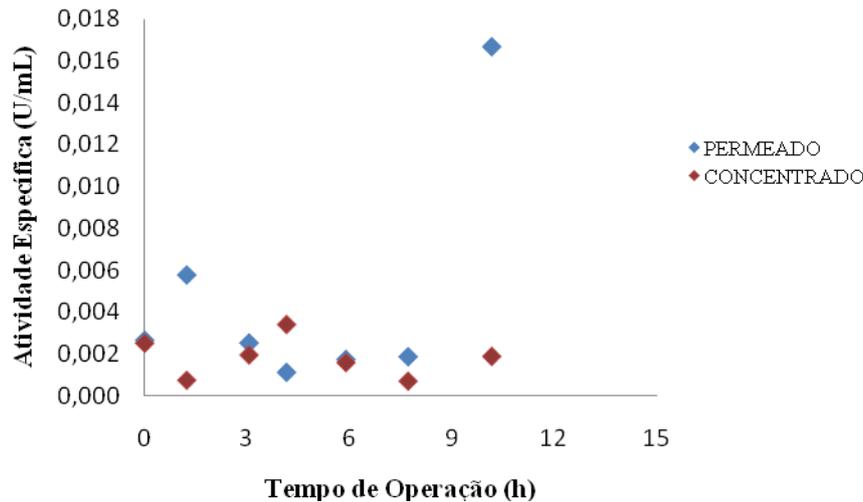


Figura 5: Atividade específica da bromelina

O longo tempo de operação tende a inviabilizar o processo de separação por membrana, sendo necessários estudos que reduzam este tempo e conseqüentemente aumente a atividade e o grau de purificação da enzima em questão. Este fato pode ser explicado pelo tempo de operação prolongado, durando até 24 horas por ensaio, além do *foulling* formado e da polarização.

4. CONCLUSÃO

Com base nos estudos realizados, pode-se concluir que o presente trabalho oferece uma nova alternativa para recuperar a enzima bromelina proveniente do abacaxi, agregando valor a este fruto, a partir do uso de membranas cerâmicas e reduzindo os custos de produção da mesma, uma vez que ainda é necessário a sua importação por diversos setores industriais, especialmente a indústria de medicamentos, em decorrência da não obtenção desta enzima com alto grau de pureza e atividade no País.

-
1. CESAR, A. C.W., Otimização dos parâmetros de extração líquido-líquido em duas fases aquosas na recuperação da bromelina presente no abacaxi, 2000. 67 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
 2. TAY, J. H.; JEYASEELAN, S. Membrane filtration for reuse of wastewater from beverage industry. *Resources, Conservation and Recycling*, v. 15, p. 33–40. 1995.
 3. LOPES, F.L.G., Recuperação da bromelina a partir da polpa do *Ananas comosus* L-merrill, utilizando processo de separação por membrana, 2005. 157 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
 4. LEHNINGER, A.L., Princípios da Bioquímica, Savier, 1995
 5. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. v. 72, p. 248-254. 1976.
 6. MURACHI, T., Bromelain enzymes, In: Lorand, L. *Methods in enzymology*, v.XLV, p.475-85, New York, Academic Press, 1976.
 7. BALDINI, V. L.; IADEROZA, M.; FERREIRA, E. A.H.; SALES, A. M.; DARAETTA, I. S.; GIACOMELLI, E. J. Ocorrência da bromelina em cultivares de abacaxizeiro. *Coletânea do ITAL*, Campinas. V.23, n.1, p.44-55. 1993