



Acta Scientiarum. Technology

ISSN: 1806-2563

eduem@uem.br

Universidade Estadual de Maringá
Brasil

Jorge Elias, Moacyr; Fabian Arcuri, Ivan; Basile Tambourgi, Elias
Avaliação das condições de melhor estabilidade térmica para a recuperação da bromelina a partir de
resíduos do abacaxi
Acta Scientiarum. Technology, vol. 33, núm. 3, 2011, pp. 281-286
Universidade Estadual de Maringá
Maringá, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=303226532006>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Avaliação das condições de melhor estabilidade térmica para a recuperação da bromelina a partir de resíduos do abacaxi

Moacyr Jorge Elias^{1*}, Ivan Fabian Arcuri¹ e Elias Basile Tambourgi²

¹Instituto Mauá de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, Praça Mauá, 1, 09580-900, São Caetano do Sul, São Paulo, Brasil. ²Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas, São Paulo, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: moacyr@maua.br

RESUMO. Visando à recuperação da bromelina a partir dos resíduos da industrialização do abacaxi, variedade pérola, foi pesquisada a melhor condição de pH para qual a enzima é mais estável ao longo do tempo em diversas temperaturas. Ensaios foram efetuados medindo a atividade enzimática da bromelina pura e do extrato dos resíduos do fruto, empregando caseína como substrato. O extrato foi obtido pela Trituração da casca e do talo interno do fruto. A atividade foi expressa em mmol tirosina (L min.⁻¹), pela absorbância a 280 nm dos aminoácidos aromáticos gerados na hidrólise da caseína. Duas faixas de pH foram estudadas: 5,5 a 6,5 e 3,3 a 3,5 e temperatura variando de 25 a 62°C. A constante de inativação (k_i) foi determinada ao analisar o gráfico da atividade em função do tempo para cada temperatura. A decomposição térmica mostrou ser de ordem um e a energia de ativação para a enzima do fruto maior do que a bromelina purificada quando o pH está na faixa de 3,3 a 3,5. Para recuperação da enzima presente no resíduo do fruto deve-se trabalhar com pH entre 5,5 e 6,5 visto que a decomposição térmica é desprezível na faixa de temperatura estudada (até 62°C).

Palavras-chave: *ananas comosus*, enzima, decomposição, proteinase, protease.

ABSTRACT. **Bromelain: better thermal stability conditions for its recovery from pineapple residues.** Aiming the bromelain recovery from industrialization residues of pineapple (pérola variety), we assessed the better pH conditions in which the enzyme is more stable over time, and under several temperatures. The assays were carried out measuring the enzymatic activity of the pure bromelain and of the extract of fruit residues, using casein as substrate. The extract was obtained by crushing the peel and core of the fruit. The activity was expressed as mmol tyrosina (L min.⁻¹) through the absorbance at 280 nm of aromatic amino acids generated from the casein hydrolysis. Two pH ranges were studied: 5.5 to 6.5 and 3.3 to 3.5 and temperatures from 25 to 62°C. The inactivation parameter (k_i) was determined plotting the activity as a function of time for each temperature. The thermal decomposition showed to be of first order and the activation energy higher for the fruit enzyme than the purified bromelain when the pH ranged from 3.3 to 3.5. A pH between 5.5 and 6.5 should be applied in order to recover the enzyme from the fruit residues, due to the negligible thermal decomposition in the studied temperature range (up to 62°C).

Keywords: *ananas comosus*, enzyme, decomposition, proteinase, protease.

Introdução

A bromelina pertence ao grupo de proteases que tem a característica de hidrolisar ligações peptídicas das proteínas, é encontrada no abacaxi (*Ananas comosus*), cujas enzimas são referidas de forma genérica como “bromelinas” (ROWAN, 2004). Como estão intimamente relacionadas é possível tratá-las como uma entidade única; substratos suscetíveis à bromelina incluem muitas proteínas comuns, como caseína, gelatina, colágeno, globulinas e fibra muscular. A bromelina do abacaxizeiro existente no Brasil (*Ananas comosus* (L.) Merrill) é uma protease encontrada no fruto, talo,

caule, folhas e raízes (FREIMAN; SABAA SRUR, 1999).

A bromelina pode ser obtida das diversas partes do abacaxizeiro. Segundo Freiman e Sabaa-Srur (1996), o processo envolve a desintegração das partes da planta e filtração, obtendo-se o extrato bruto, e, a seguir, precipitação com álcool etílico e centrifugação. Pode-se recuperar praticamente toda bromelina do abacaxi empregando a precipitação em um estágio com etanol a 5°C. A extração da bromelina por micelas reversas foi estudada por Hemavathi et al. (2007) e Umesh et al. (2008).

A bromelina tem aplicação em diversas áreas. Na indústria de alimentos pode ser usada para hidrolisar a miosina produzindo efeito de amaciamento da carne (FREIMAN, 2001). Na medicina, foi demonstrado que a bromelina é capaz de reduzir o crescimento de tumores; a bromelina pode ser de interesse para os cirurgiões plásticos pela sua capacidade de reduzir dor, edema e inflamação, além de potencializar antibióticos, o que pode ser benéfico no pós-operatório (ORSINI, 2006). A bromelina do abacaxi serve como auxiliar digestivo na quebra de proteínas (ROXAS, 2008). A bromelina também é empregada como reagente na análise do sangue.

Com relação à desativação térmica da bromelina, as publicações consultadas (LI; LIN, 2001; SRIWATANAPONGSE et al., 2000; YODOYA et al., 2003) referem-se a ela como sendo uma cinética de ordem 1: em reatores batelada o balanço molar para a decomposição de ordem um da enzima leva à expressão $\frac{dC_E}{dt} = -k_i \cdot C_E$ em que: C_E é a concentração de enzima e t é o tempo; integrando ($C_E = C_{E0}$ para $t = 0$) vem: $-\ln\left(\frac{C_E}{C_{E0}}\right) = k_i \cdot t$. Uma

vez que a atividade enzimática tem uma relação direta com a concentração de enzima, para ensaios efetuados em reator batelada a decomposição térmica pode ser expressa na forma da equação (1).

$$-\ln\left(\frac{A}{A_0}\right) = k_i \cdot t \quad (1)$$

em que:

A é a atividade enzimática após um tempo t , A_0 a atividade enzimática inicial e k_i (constante de velocidade de inativação) segue a lei de Arrhenius (equação 2).

$$k_i = k_0 \cdot e^{-\frac{E}{RT}} \quad (2)$$

em que:

k_0 é o fator de frequência, E é a energia de ativação, R é uma constante [$R = 8,314 \text{ J} \cdot (\text{mol K})^{-1}$], e T é a temperatura em graus Kelvin.

A realização de ensaios a diversas temperaturas permite a avaliação da energia de ativação E aplicando a equação (3), obtida pela transformação da equação (2).

$$\ln k_i = \ln k_0 - \frac{E}{RT} \quad (3)$$

O objetivo deste trabalho foi pesquisar quanto ao pH para melhor estabilidade térmica da enzima bromelina encontrada na casca e no talo do abacaxi brasileiro (variedade pérola), tendo em vista a sua recuperação aproveitando os resíduos gerados na industrialização do fruto. Para tanto, foram avaliadas as constantes de inativação térmica k_i a diversas temperaturas, energias de ativação E , e fatores de frequência k_0 .

Material e métodos

O abacaxi foi adquirido no mercado local (São Caetano do Sul, Estado de São Paulo). Os frutos foram lavados e cortados, separando-se a casca e o talo interno, que foram triturados juntos. O extrato foi coletado em frascos plásticos de 500 mL e estocado em freezer a 20°C negativos. Imediatamente antes dos ensaios, elevou-se a temperatura do extrato até a ambiente e centrifugou-se (5.000 rpm) por 3 min. para separar os sólidos. Como referência, foi empregada bromelina pura liofilizada (Fluka and Riedel Haën, lote 444431/1). O substrato foi a caseína (caseína pura C1014.06.AG, lotes 78689 e 105320 fornecida pela Labsynth).

As reações de hidrólise da caseína foram efetuadas em reator (75 mL volume útil) em constante agitação. A relação enzima/substrato foi de 1/25 (em massa), com a concentração de enzima de 0,533 g L⁻¹ e a concentração de caseína de 13,33 g L⁻¹ no reator. A quantidade de extrato do abacaxi foi previamente determinada como a necessária para fornecer a mesma atividade produzida nos ensaios com bromelina pura.

As dispersões de bromelina pura, do extrato do abacaxi e da caseína foram mantidas separadas em banho na temperatura e pH determinado. Duas séries de ensaios foram programadas para a enzima: uma com pH entre 5,5 e 6,5 e outra entre 3,3 e 3,5 e nos dois casos a dispersão de caseína ficou entre o pH 5,5 e 6,5. Como tanto para a bromelina pura quanto para o extrato do abacaxi o pH natural ficou entre 3,6 e 3,8, a faixa de pH de 3,3 a 3,5 foi facilmente atingida pela adição de pequena quantidade de HCl 1 mol L⁻¹ (proporção de 1 mL para cada 65 mL de dispersão). Para o pH entre 5,5 e 6,5 as dispersões de bromelina e extrato foram tamponadas: 1 mL de tampão fosfato (68 g KH₂PO₄ mais 87 g K₂HPO₄ diluídos para 1 L) para cada 20 mL de dispersão. Para evitar a precipitação da caseína nos ensaios em que a dispersão da enzima ficou no pH de 3,3 a 3,5, imediatamente antes do contato entre as dispersões foi adicionada (à enzima) solução de

NaOH (quantidade e concentração determinadas por ensaios prévios) para que o pH atingisse o valor da dispersão de caseína, mantido com tampão. Ao longo do tempo, as dispersões ficaram no pH e temperatura pré-determinados, porém a hidrólise da caseína para determinação da atividade enzimática foi efetuada no pH da caseína (5,5 a 6,5) para todos os casos (foram efetuados alguns ensaios os quais mostraram serem desprezíveis as variações de atividade com a variação do pH de 5,5 a 6,5).

Foram retiradas alíquotas de enzima e caseína ao longo do tempo, obedecendo a relação em massa de 1 enzima/25 substrato, adicionadas ao reator deixando reagir por 10 min. Após o tempo de reação foi pipetada uma amostra do meio reacional e adicionada em tubo de centrifuga contendo ácido tricloro acético (TCA) 0,3 mol L⁻¹. Centrifugou-se (5.000 rpm) por 20 min. e determinou-se a absorbância do sobrenadante a 280 nm. Os aminoácidos aromáticos gerados na reação de hidrólise foram expressos em mmol tirosina L⁻¹ empregando uma curva de calibração da concentração de tirosina pura (mmol tirosina L⁻¹) em função da absorbância. Assim, a atividade enzimática foi expressa em mmol tirosina (L min)⁻¹. Substâncias presentes na bromelina pura e na caseína que absorvem a 280 nm foram previamente determinadas e consideradas nos cálculos; para o extrato do abacaxi foi determinado um branco para cada conjunto de ensaios: adicionou-se a quantidade de extrato, avolumou-se para 75 mL com água, uma amostra foi retirada e adicionada em TCA 0,3 mol L⁻¹, centrifugada e a absorbância do sobrenadante lida a 280 nm.

Os ensaios foram realizados em duplicata a diversas temperaturas e os resultados encontrados para a atividade apresentados em um gráfico de $-\ln\left(\frac{A}{A_0}\right)$ em função do tempo, de onde se obtiveram as constantes de inativação k_i . Os valores encontrados para k_i foram ajustados considerando $\ln k_i$ em função de T^{-1} , permitindo o cálculo da energia de ativação E, e do fator de frequência k_0 .

Resultados e discussão

Os resultados obtidos para a atividade enzimática ao longo do tempo referentes à bromelina pura, para o pH entre 5,5 e 6,5 e entre 3,3 e 3,5, foram ajustados na forma da equação (1), cujos gráficos encontram-se nas Figuras 1 e 2, onde os pontos referem-se aos resultados experimentais e as retas ao tratamento estatístico (regressão linear). Na Figura 1 observa-se que para o

pH entre 5,5 e 6,5 e temperatura de 62°C, a decomposição térmica pode ser explicada por uma ordem maior, uma vez que os resultados não se ajustam ao modelo de ordem um, confirmando o observado por Sriwatanapongse et al. (2000). A Figura 2 mostra que no pH 3,3 a 3,5, para as temperaturas de 53°C e 62°C, a enzima perde a atividade nos primeiros 60 min. de ensaio.

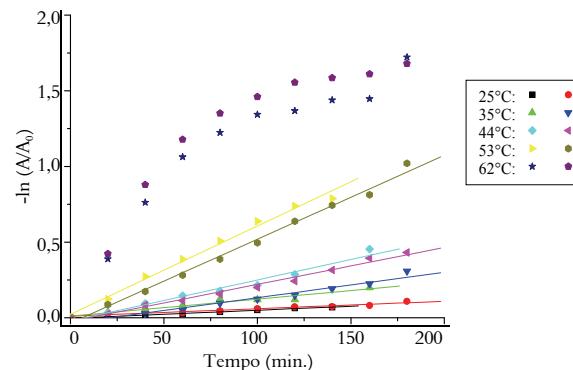


Figura 1. Atividade ao longo do tempo – bromelina pura: pH 5,5 a 6,5.

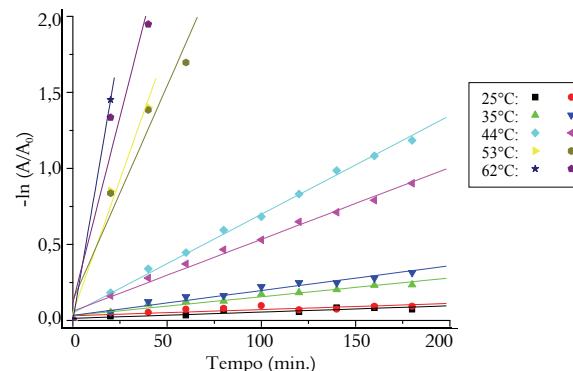


Figura 2. Atividade ao longo do tempo – bromelina pura: pH 3,3 a 3,5.

As retas das Figuras 1 e 2 foram obtidas a partir do ajuste dos resultados experimentais conforme a equação (1), cujos coeficientes angulares correspondem à constante de inativação k_i . A Tabela 1 apresenta os valores encontrados para k_i com os respectivos coeficientes de correlação linear (r^2).

Tabela 1. Valores da constante de inativação k_i para bromelina pura.

Temperatura (°C)	ensaio	pH 5,5 a 6,5		pH 3,3 a 3,5	
		$k_i \cdot 10^4$ (min.) ⁻¹	r^2	$k_i \cdot 10^4$ (min.) ⁻¹	r^2
25	1	5,33	0,99	4,13	0,82
	2	4,90	0,90	4,03	0,62
35	1	11,2	0,95	12,3	0,95
	2	16,8	0,96	16,1	0,95
44	1	27,1	0,97	64,9	0,99
	2	24,4	0,98	47,2	0,99
53	1	58,4	0,99	351	0,98
	2	55,4	0,99	282	0,96
62	1	– (*)	– (*)	726	1,00
	2	– (*)	– (*)	487	0,96

(*) cinética da inativação não obedece à ordem um; r^2 : coeficiente de correlação linear.

Observando as Figuras 1 e 2 e considerando os coeficientes de correlação linear da Tabela 1, verifica-se que o modelo de ordem um é adequado para explicar como a enzima perde atividade ao longo do tempo (com exceção do pH entre 5,5 e 6,5 e temperatura de 62°C). A constante de inativação k_i aumenta bem mais com a temperatura para a bromelina pura no pH 3,3 a 3,5 quando comparada com o pH entre 5,5 e 6,5. Para o primeiro ensaio a 62°C no pH 3,3 a 3,5, o coeficiente de correlação apresentou valor 1,00 porque a reta foi determinada com apenas dois pontos; decidiu-se manter o valor de k_i obtido neste caso porque ele se alinha com os valores de k_i para outras temperaturas no cálculo da energia de ativação.

O valor da energia de ativação (E) e do fator de frequência (k_0) foram obtidos pela equação (3) a partir dos valores da Tabela 1, e os resultados estão mostrados na Tabela 2. Os valores do coeficiente de correlação indicam que o modelo de Arrhenius (equação 2) é adequado para explicar como a constante de inativação k_i varia em função da temperatura.

Tabela 2. Energia de ativação (E) e fator de frequência (k_0) para bromelina pura.

Ensaio	pH 5,5 a 6,5			pH 3,3 a 3,5		
	k_0 (min. ⁻¹)	E (kJ mol ⁻¹)	r^2	k_0 (min. ⁻¹)	E (kJ mol ⁻¹)	r^2
1	$8,73 \times 10^{-8}$	69,8	0,99	$1,45 \times 10^{-18}$	123	0,98
2	$2,84 \times 10^{-8}$	66,8	0,97	$1,98 \times 10^{-16}$	112	0,99

r^2 : coeficiente de correlação linear.

Arroyo-Reyna e Hernandez-Arana (1995) ensaiaram, em pH 3,4, a desnaturação térmica da bromelina purificada em laboratório, encontrando valores de 146 a 216 kJ mol⁻¹ para a energia de ativação. Os resultados da Tabela 2 indicam a forte influência do pH na decomposição térmica da bromelina ao longo do tempo.

Para o extrato obtido a partir dos resíduos do abacaxi, os resultados mostraram que quando o pH está entre 5,5 e 6,5, a atividade enzimática ao longo do tempo apresenta valores em torno do inicial, portanto, desativação térmica desprezível. A Figura 3 apresenta estes resultados.

A queda da atividade enzimática com o tempo para o extrato dos resíduos do abacaxi mostrou ser bem acentuada quando o pH está entre 3,3 e 3,5 para temperaturas superiores a 35°C, e a desativação ocorre praticamente no início para temperaturas maiores que 53°C. Para temperaturas de 25 e 35°C pode-se considerar que não houve desativação. A Figura 4 mostra os resultados para temperaturas de 44 a 53°C.

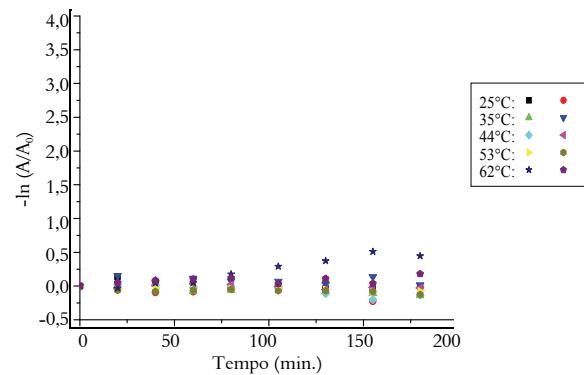


Figura 3. Atividade ao longo do tempo – extrato do resíduo do abacaxi: pH 5,5 a 6,5.

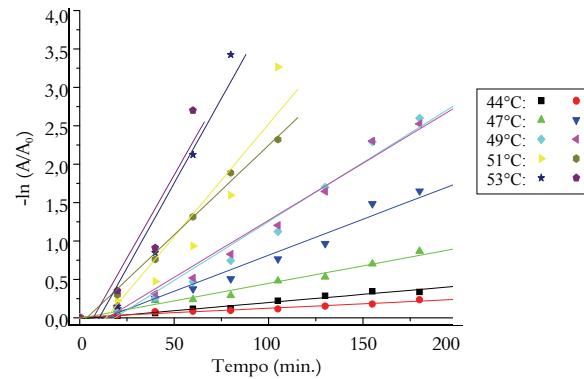


Figura 4. Atividade ao longo do tempo – extrato do resíduo do abacaxi: pH 3,3 a 3,5.

A Tabela 3 mostra as constantes de inativação k_i da enzima presente no resíduo do fruto, obtidas pelo coeficiente angular das retas da Figura 4, que estão na forma da equação (1).

Tabela 3. Valores da constante de inativação k_i para o extrato do resíduo do abacaxi.

Temperatura (°C)	ensaio	pH 3,3 a 3,5	
		$k_i \cdot 10^4$ (min. ⁻¹)	r^2
44	1	21,3	0,97
	2	11,5	0,97
47	1	45,5	0,98
	2	93,8	0,97
49	1	154	0,97
	2	149	0,97
51	1	293	0,88
	2	233	0,99
53	1	441	0,93
	2	433	0,89

r^2 : coeficiente de correlação linear.

Pela Figura 4 e os coeficientes de correlação linear da Tabela 3, o modelo de ordem um é adequado para explicar a desativação da enzima presente no resíduo do abacaxi ao longo do tempo, para o pH entre 3,3 e 3,5. A energia de ativação e o fator de frequência k_0 foram obtidos pela equação (3) a partir dos valores da Tabela 3, e estão mostrados na Tabela 4. Os valores do coeficiente de

correlação indicam que o modelo de Arrhenius (equação 2) é adequado para explicar como a constante de inativação k_i varia em função da temperatura.

Sriwatanapongse et al. (2000) testaram a estabilidade térmica da enzima referente ao fruto Smooth Cayenne pineapple, adquirido localmente e testado na Universidade da Flórida, encontrando o valor de $1,37 \times 10^{50}$ para o fator de frequência k_0 e de 326 kJ mol^{-1} para a energia de ativação E . Observa-se que os valores obtidos estão bem próximos ao da literatura citada.

Tabela 4. Energia de ativação (E) e fator de frequência (k_0) para o resíduo do abacaxi.

Ensaios	pH 3,3 a 3,5		
	$k_0 (\text{min.}^{-1})$	E (kJ mol^{-1})	r^2
1	$1,36 \times 10^{48}$	309	0,97
2	$1,91 \times 10^{51}$	328	0,93

r^2 : coeficiente de correlação linear.

A forte decomposição observada para o pH entre 3,3 e 3,5 pode ser atribuída à ação catalítica dos íons H^+ , que estariam favorecendo a hidrólise das ligações peptídicas da enzima, conforme ilustra a Figura 5.

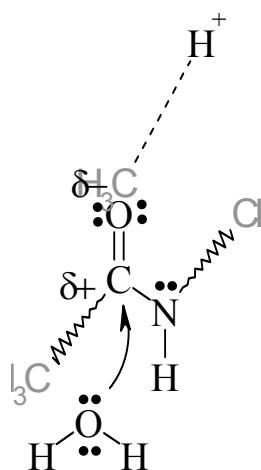


Figura 5. Ação catalítica do íon H^+ na decomposição da enzima.

O modelo de ordem um mostrou ser adequado para representar a decomposição térmica da bromelina. Considerando que o fenômeno se dá pelo mecanismo de hidrólise, fica mais adequado considerá-lo como pseudo ordem um, porque para a reação: enzima + $\text{H}_2\text{O} \rightarrow$ produtos, a velocidade r da reação pode ser escrita: $r = k C_{\text{enzima}} C_{\text{H}_2\text{O}}$, em que k é a constante de velocidade da reação, C_{enzima} e $C_{\text{H}_2\text{O}}$ as concentrações de enzima e de água, respectivamente; como a concentração da água é praticamente constante durante a reação, a equação da velocidade reduz-se a: $r = k' C_{\text{enzima}}$.

Conclusão

Para a recuperação da bromelina presente nos resíduos do abacaxi deve-se trabalhar com o pH entre 5,5 e 6,5 uma vez que os resultados indicam que é desprezível a perda de atividade nesta condição, na faixa de temperatura estudada (25 a 62°C). Com o pH entre 3,3 e 3,5 a perda de atividade é acentuada; atribui-se aos íons H^+ a forte decomposição nesta faixa de pH, íons que estariam atuando como catalisador na hidrólise das ligações peptídicas.

A estabilidade térmica da enzima do resíduo do abacaxi brasileiro apresenta o mesmo comportamento encontrado para o fruto Smooth Cayenne pineapple.

Agradecimentos

À Escola de Engenharia Mauá do Instituto Mauá de Tecnologia, por ter disponibilizado os laboratórios do Departamento de Engenharia Química e de Alimentos para a execução da parte experimental deste trabalho.

Referências

- ARROYO-REYNA, A.; HERNANDEZ-ARANA, A. The thermal denaturation of stem bromelain is consistent with an irreversible two-state model. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1248, n. 2, p. 123-128, 1995.
- FREIMAN, O. L. Advantages of bromelain use in food processing and medicine. *Alimentos e Nutrição*, v. 12, n. 4, p. 215-226, 2001.
- FREIMAN, L. O.; SABAA SRUR, A. U. O. Use of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merril) agroindustrial residues for the production of bromelain. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, v. 16, n. 3, p. 246-249, 1996.
- FREIMAN, L. O.; SABAA SRUR, A. U. O. Determination of total protein and amino acid composition of bromelains extracted from pineapple plant residues (*Ananas comosus*, (L.) Merril). *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, v. 19, n. 2, p. 170-173, 1999.
- HEMAVATHI, A. B.; HEBBAR, H. U.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Reverse micellar extraction of bromelain from *Ananas Comosus* L. Merril. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 82, n. 11, p. 985-992, 2007.
- LI, X.; LIN, Z. Effect of carboxyl Ca^{2+} , and Zn^{2+} on bromelain thermal stability. *Yaowu Shengwu Jishu*, v. 8, n. 6, p. 339-341, 2001.
- ORSINI, R. A. Bromelain. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 118, n. 7, p. 1640-1644, 2006.
- ROXAS, M. The role of enzyme supplementation in digestive disorders. *Alternative Medicine Review*, v. 13, n. 4, p. 307-314, 2008.
- ROWAN, A. D. Fruit bromelain. *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 2nd ed. New York: Elsevier, 2004. v. 2, p. 1137-1138.
- SRIWATANAPONGSE, A.; BALABAN, M.; TEIXEIRA, A. Thermal inactivation kinetics of bromelain in pineapple

juice. **Transactions of the ASAE**, v. 43, n. 6, p. 1703-1708, 2000.

UMESH, H. H.; 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.

YODOYA, S.; TAKAGI T.; KUROTANI, M.; HAYASHI T.; FURUTA, M.; OKA, M.; HAYASHI, T. Immobilization of bromelain onto porous copoly (γ -

methyl-L-glutamate/L-leucine) beads. **European Polymer Journal**, v. 39, n. 1, p. 173-180, 2003.

Received on October 7, 2009.

Accepted on January 26, 2011.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.