

PURIFICAÇÃO DA ENZIMA BROMELINA PRESENTE NO CURAUÁ (*Ananas erectifolius* L.B. SMITH) VARIEDADE ROXA, POR SISTEMA BIFÁSICO AQUOSO PEG 4000/FOSFATO DE POTÁSSIO

**Juliana Ferrari Ferreira¹, Dalva Sbruzzi², Kleber Vânio Gomes Barros³,
Isaac Stringueta Machado⁴, Elias Basile Tambourgi⁵**

RESUMO

O curauá (*Ananas erectifolius* L.B. Smith) é uma planta característica do Norte e Centro-oeste do Brasil e produz uma fibra de alta resistência, com aplicações nas diversas áreas, principalmente na indústria automobilística. Pertencente à família das Bromeliaceae, contém níveis significativos de bromelina, conjunto de enzimas proteolíticas com aplicação em diferentes áreas, tais como em indústrias alimentícias, farmacêuticas e de cosméticos. Neste trabalho avaliou-se a purificação da enzima presente nas folhas do curauá (*Ananas erectifolius* L.B. SMITH), através de sistema bifásico aquoso PEG 4000/Fosfato de potássio e se mediu a atividade enzimática em cada fase, pelo método de Biureto, obtendo-se o fator de purificação (FP), com o objetivo de otimizar as condições de purificação da bromelina. Utilizaram-se 3 valores de pH 7,0; 8,0 e 9,0 variando-se a composição proporcional entre a fase polimérica e a salina (tie-lines). Foi utilizada a variedade roxa do curauá, em que os resultados mostraram que o sistema PEG 4000/Fosfato de potássio com maior concentração polimérica e em pH 7,0, apresentou melhor resultado na purificação enzimática.

Palavras-chave: *Ananas erectifolius*, bromelina, purificação, sistema bifásico aquoso, pH

PURIFICATION OF BROMELAIN ENZYME FROM CURAUÁ (*Ananas erectifolius* LB Smith) PURPLE VARIETY, BY AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM PEG 4000/POTASSIUM PHOSPHATE

ABSTRACT

Curauá (*Ananas erectifolius* LB Smith) is a typical plant of northern and central-western Brazil. It produces a highly strong fiber with applications in several areas, mainly in the automotive industry. Belonging to the family of Bromeliaceae, it contains significant levels of bromelain, a group of proteolysis' enzymes with application in several areas such as in the food, pharmaceutical and cosmetics industries. In this work we evaluated the purification of the enzyme present in the leaves of Curauá by means of an aqueous two-phase system PEG 4000/Potassium phosphate. The enzyme had its activity measured in each phase by the Biuret method. The purification factor (PF) was obtained in order to optimize the conditions for purification of the bromelain. It was used 03 pH 7.0, 8.0 and 9.0 values, varying the proportional composition in between the polymeric and the saline phases (tie-lines). It was used the purple variety of Curauá. The results showed that PEG system 4000/ potassium phosphate polymer with a higher concentration and at pH 7.0 produced better results in enzyme purification.

Keywords: *Ananas erectifolius*, bromelain, purification, aqueous two-phase systems, pH

Protocolo 12-2010-12 de 01/06/2010

¹ Pesquisadora, Doutoranda, Unicamp, Rua Dr. Antonio Álvares Lobo, 398, apto 124 Jd. Botafogo Campinas-SP CEP:13020-110, jferrarif@hotmail.com, (19) 9256-2676

² Pesquisadora, Mestranda, Unicamp, R. Joaquim Nabuco, 1737 apto 502, Capoeiras CEP 8809060 – Florianópolis, SC, dalvasbruzzi@gmail.com, (48) 9116-6457,

³ Pesquisador, Mestre, Unicamp, Q210, Lote 06, Bloco B, Residencial Imprensa II, Águas Claras – DF, CEP 71931-000, (61) 9160-1825,

⁴ Prof. Assist. Doutor, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Fazenda Experimental Lageado, CEP 18603-970 - Botucatu, SP, Brasil, Caixa Postal: 237, isaac@fca.unesp.br, Telefone: (14) 3811-7100 Ramal: 7162 Fax: (14) 38117202

⁵ Professor adjunto, Pós-Doutor, Unicamp, Cidade Universitária "Zeferino Vaz" - Caixa Postal 6066 - CEP: 13083-970, Av. Albert Einstein, 500 - CEP 13083-852 – Campinas, SP - Brasil, eliastam@feq.unicamp.br (19) 3521-3952 FAX: 55 + 19 + 3521-3910

INTRODUÇÃO

Enzimas são moléculas orgânicas presentes nas células de organismos vivos, com a função específica de catalisar reações químicas. A enzima dá início ao aumento da velocidade de uma reação química, por atuar como catalisador (Said & Pietro, 2002). Um catalisador não modifica a posição de equilíbrio de uma reação; no entanto, diminui o montante de energia necessária para que a reação ocorra (Horton, 2002).

Economicamente viáveis, o emprego de enzimas em diversos setores industriais vem crescendo há vários anos (Forgaty & Kelly, 1979; Wiseman, 1987). Dentre as enzimas com utilização industrial a bromelina se destaca pela diversidade de áreas de atuação: no tratamento de couro nas indústrias têxteis, para o amaciamento de fibras e na produção de detergentes (Santos, 1995); na indústria alimentícia, promovendo o amaciamento de carnes (Freiman, 2001); nas cervejarias é utilizada para clarificação da cerveja, hidrolisando certos complexos proteína-taninos, formados durante a fermentação (Freiman & Srur, 1999). Na área de pesquisa farmacológica, por exercerem efeitos anti-inflamatórios (Mattos, 2005) e na utilização no tratamento de problemas de saúde, tais como: angina, indigestão e problemas respiratórios (Cesar, 2005). Nas terapias contra o câncer é utilizada no aumento de lises de células cancerígenas (Meinig, 1999).

O curauá (*Ananas Erectifolius*) é uma espécie ainda pouco conhecida e estudada. O cultivo do curauá teve início no Lago Grande de Curuaí, no município de Santarém, PA, e se vem expandindo para outras regiões do estado. Pesquisas demonstraram que a fibra do curauá apresenta excelente qualidade, sendo comparável à fibra de vidro devido à sua resistência, maciez e peso reduzido (Leão et al., 1998; Frollini et al., 2000). Na indústria automobilística vem sendo usado para fabricação de pára-sois de caminhão (Mothé, 2003).

Atualmente, o processo de separação e purificação de bioprodutos é um segmento muito importante na indústria, pois pode chegar a representar de 80 a 90% do custo de produção. Portanto, o desenvolvimento de um processo eficiente e de baixo custo é de extrema relevância (Belter et al, 1988). A extração líquido-líquido vem despertando

interesse a fim de ser utilizada como etapa intermediária de separação, que substitui métodos de separação mais caros ou diminui o número de etapas de separação necessárias ao processo. Este processo de separação é baseado na distribuição do soluto entre as fases e a miscibilidade parcial dos líquidos (Rabelo, 1999).

Os sistemas bifásicos aquosos (SBA) se formam pela adição de soluções aquosas de dois polímeros hidrofílicos, como PEG (polietilenoglicol) e dextrana ou de um polímero e um sal, como PEG e fosfato de potássio. Essas substâncias constituem o meio conveniente e adequado para a extração de substâncias de origem biológica, pois a constituição das fases entre 70% e 90% de água, proporciona um ambiente ameno para o trabalho, com compostos biologicamente ativos, preservando sua estabilidade molecular e permitindo, assim, seu processamento neste meio (Coimbra, 1995).

O pH do meio, além de influenciar na manutenção da atividade enzimática ainda afeta a distribuição de cargas na superfície das proteína. Deste modo, ajustando-se o pH do meio a valores próximos ao ponto isoelétrico (PI) da proteína (valor de pH, onde a molécula apresenta carga elétrica líquida próximo a zero), tem-se reduzido os efeitos que atuam sobre a partição em SBA (sistemas bifásicos aquosos) (Forciniti et al., 1991).

Ferreira (2007) analisou a purificação da enzima bromelina em sistema bifásico aquoso PEG/Fosfato de potássio extraída do talo do abacaxi (*Ananas comosus*) e obteve melhores resultados ao utilizar polietileno glicol 4000, do que polímero de menor massa molecular (PEG 1500).

Assim, este trabalho teve como objetivo a obtenção dos fatores de purificação (FP) da enzima bromelina derivada do curauá (*Ananas erectifolius* L.B. SMITH) variedade roxa, através de sistema bifásico aquoso PEG 4000/Fosfato de potássio.

MATERIAL E MÉTODOS

Os equipamentos utilizados foram: Balança Eletrônica Marte, modelo AL 200; um multiprocessador Arno; pHmêtro Analyser pH 300; Banho termostaticado FANEM; modelo 100, Micropipetas automáticas e Espectrofotômetro UV/VIS Spectronic 21D.

Métodos

As folhas do curauá foram coletadas no campo, na Fazenda Experimental São Manoel, Botucatu, SP. Chegando ao laboratório elas foram lavadas com água destilada, secadas com papel toalha e armazenadas em sacos plásticos, sob refrigeração, até sua utilização.

Preparo das amostras

Foram pesadas, na proporção 1:1, solução tampão e folhas de curauá da variedade roxa; em seguida, foram trituradas em um multiprocessador de alta eficiência e o extrato foi filtrado em tela de nylon, para a retirada de fibras e particulados presentes.

Preparo do reativo de biureto

Dissolveram-se, em 500 mL de água destilada, 1,5 g de sulfato de cobre pentaidratado e 6,0 g de tartarato duplo de sódio e potássio e se eles adicionaram 300 mL de solução de hidróxido de sódio a 10% em constante agitação; por fim, adicionou-se água destilada suficiente para 1 Litro de solução.

Determinação da atividade da bromelina

Visando à determinação da atividade da bromelina, utilizaram-se o reativo de Biureto e uma solução a 5 g/L de BSA, método que se baseia na reação do reativo do Biureto, 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 a 540 nm; por fim, calculou-se a atividade enzimática, segundo a equação (1):

$$AE = \frac{V_{reator}(\text{Litros}) \times 10^6 (\mu\text{mol}/\text{mL})}{MM_{BSA} \times V_{enzima}(\text{ml}) \times t_{reação}(\text{min})} \quad (1)$$

Preparo dos tampões

Foram preparadas as soluções tampão pH 7,0; 8,0 e 9,0, a partir de soluções de fosfato de potássio mono e dibásico a 15% (p/p), seguindo a metodologia descrita por Morita e Assumpção (1995). Para isto, prepararam-se soluções padrão de fosfato de potássio monobásico (solução A) e fosfato de potássio bibásico (solução B), misturando-as em um béquer contendo um eletrodo de cloreto de prata, para medir o pH do meio, até atingir o pH desejado.

Determinação do fator de purificação

Para o cálculo do fator de purificação (FP) utilizou-se a equação (2).

$$FP = \frac{AE}{AE (BRUTA)} \quad (2)$$

sendo: Atividade enzimática bruta (U/mL): Produto do volume usado do extrato de bromelina (volume de amostra bruta no tampão e em cada “tie-line” específica) pela atividade medida para a bromelina neste tampão (em U/mL).

Atividade Enzimática (fase leve): Produto do volume da fase leve (para cada “tie-line” e pH) pela atividade medida na fase leve.

Atividade Enzimática (fase pesada): Produto do volume da fase pesada (para cada “tie-line” e pH) pela atividade medida na fase pesada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Tabelas 1, 2 e 3 mostram a influência do pH e da concentração do sistema PEG 4000/Fosfato de potássio em relação à purificação da enzima bromelina derivada do Curauá, variedade roxa.

O gráfico 1 demonstra os valores comparativos para os fatores de purificação (FP) obtidos para enzima bromelina derivada das folhas do curauá roxo, a partir de SBA PEG 4000/fosfato, nos pH 7,0; 8,0 e 9,0.

Tabela 1 - Partição da enzima bromelina derivada das folhas do curauá roxo, a partir de SBA PEG 4000/fosfato em pH 7,0

Tie line – Composição total do sistema (%p/p)			Amostra	AE (U/mL)	FP
			Bruta	0,0026	
1					3,34
PEG	Sal	Água	Fase leve	0,008706	
16,23	13,5	70,27	Fase pesada	0,005804	
2					2,16
PEG	Sal	Água	Fase leve	0,005555	
12,4	13,4	74,2	Fase pesada	0,005638	
3					2,09
PEG	Sal	Água	Fase leve	0,005348	
8,51	13,5	77,99	Fase pesada	0,005441	

Tabela 2 - Partição da enzima bromelina derivada das folhas do curauá roxo, a partir de SBA PEG 4000/fosfato em pH 8,0

Tie line – Composição total do sistema (%p/p)			Amostra	AE (U/mL)	FP
			Bruta	0,0035	
1					1,63
PEG	Sal	Água	Fase leve	0,005721	
16,95	11,7	71,37	Fase pesada	0,005265	
2					2,86
PEG	Sal	Água	Fase leve	0,010033	
14,88	11,5	73,73	Fase pesada	0,008084	
3					2,93
PEG	Sal	Água	Fase leve	0,010281	
12	11	77	Fase pesada	0,007960	

Tabela 3 - Partição da enzima bromelina derivada das folhas do curauá roxo, a partir de SBA PEG 4000/fosfato em pH 9,0

Tie line – Composição			Amostra	AE (U/mL)	FP
total do sistema (%p/p)			Bruta	0,0034	
1					
PEG	Sal	Água	Fase leve	0,005576	1,64
19,8	13,5	66,7	Fase pesada	0,005203	
2					
PEG	Sal	Água	Fase leve	0,011318	3,32
18,5	12,2	69,3	Fase pesada	0,008250	
3					
PEG	Sal	Água	Fase leve	0,004436	1,31
16,03	11,2	72,77	Fase pesada	0,004477	

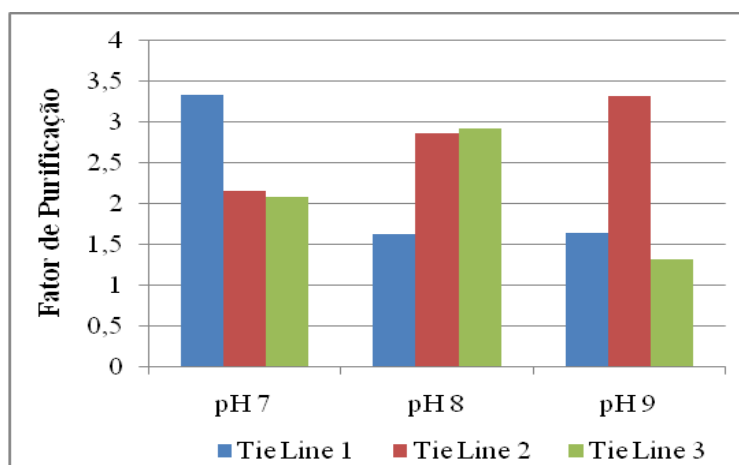


Gráfico 1 – Fatores de Purificação da purificação da bromelina das folhas de curauá roxo

O sistema bifásico aquoso que apresentou melhor resultado na purificação da enzima bromelina derivada do curauá, variedade roxa, foi o sistema PEG 4000/fosfato no pH 7,0 (“tie line” 1); o sistema PEG 4000/fosfato em pH 9,0 (“tie line” 2), também apresentou valores consideráveis. Analisando-se o comportamento das três “tie lines” do sistema PEG 4000/fosfato em pH 7,0, observa-se tendência de aumento dos fatores de purificação à medida em que se aumenta o comprimento das linhas de amarração;

entretanto, o sistema SBA PEG 4000/fosfato em pH 8,0 apresentou comportamento inverso; maiores valores referentes aos fatores de purificação foram obtidos em concentrações menores dos componentes dos sistemas.

CONCLUSÕES

Os valores do fator de purificação da enzima bromelina derivada da variedade roxa, foram influenciados pelas concentrações das

fases poliméricas e salinas, como também pelo valor de pH do meio. O melhor resultado foi obtido trabalhando-se com o menor pH estudado porém com a maior concentração polimérica ("tie line" 01) do sistema PEG 4000/fosfato no pH 7,0 ("tie line" 1).

A técnica de sistemas bifásicos aquosos PEG 4000/fosfato de potássio mostrou-se promissora na purificação da enzima bromelina derivada do curauá variedade roxa, podendo ser utilizada na extração desta enzima proteolítica, maximizando o lucro, diminuindo o impacto ambiental e o desperdício, durante a extração da fibra utilizada, por exemplo, na indústria automobilística.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Belter P. A.; Cussler, E. L.; Hu, W. S. **Bioseparations: downstream processing for biotechnology**. Minneapolis, John Wiley & Sons, 1988.
- Cesar, A. C. W. **Análise de Viabilidade Econômica de um Processo de Extração e Purificação da Bromelina do Abacaxi**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Unicamp, 2005 (Tese de doutorado).
- Coimbra, J. S. R. **Desempenho de um extrator tipo grasser na separação de proteínas do soro de queijo usando sistemas aquosos bifásicos**. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, 1995 (Tese de doutorado).
- Ferreira, J. F. **Caracterização e purificação da enzima bromelina em sistema de duas fases aquosas PEG/Fosfato**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Unicamp, 2007 (Dissertação de mestrado).
- Forciniti, D.; Hall, C.K.; Kula, M. R. **Protein partition at the isoelectric point: influence of polymer molecular weight and concentration and protein size**. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 38, p. 986-994, 1991.
- Forgaty, W.M.; Kelly, C.T. **Topics in enzyme and fermentation**. *Biotechnology*. Chichester: G. Howood - J. Wiley & Sons, 1979.
- Freiman, L.O., Srur, A.U.O. **Determinação de proteína total e escore de aminoácidos de bromelina extraídas dos resíduos do abacaxizeiro (*Ananas comosus L. merril*)**. *Ciênc. tecnol. aliment.*, v.19, n.2, p.170-173, 1999.
- Freiman, L. O. **Os avanços do uso da bromelina na área de alimentação e saúde**. *Revista Alimento e Nutrição*, São Paulo, v.12, p.215-226, 2001.
- Frollini, E.; Leão, A. L.; Mattoso, L. H. S. **Natural Polymers and Agrofibers Composites**, pp. 257 – 272, Botucatu, Brasil, USP e UNESP, 2000.
- Horton, H. R.; Moran, L. A.; Ochs, R. S.; Rawn, J. D.; Scrimgeour, K.G. **Principles of Biochemistry (Third Edition)**. Prentice-Hall/Pearson Education, Upper Saddle River, NJ, USA, p. 862, 2002.
- Leão, A. L.; Tan, I. H.; Craschi, J.C. **Curaua fiber – A tropical natural fibers from Amazon - Potential and Application in Composites**. *International Conference on Advanced Composites*, p. 557–564, Hurghada, Egito, 1998.
- Mattos, P. E. O. **Validação Clínica da Suplementação de Bromelina para Atletas**, Projeto de Pesquisa, Instituto de Farmacologia e Biologia Molecular, UNIFESP, São Paulo, 2005.
- Meinig, G.E. **Bromelain**. *phytomedicine*, v.2, p.1-2, 1999.
- Morita, T. Assumpção, R. M. V. **Manual de soluções, reagentes e solventes**. Padronização-preparação-purificação. 2.ed., São Paulo: Edgard Blücher Ltda, p. 276, 1995.
- Mothé, C. G. **Uso de programa computacional aliado às técnicas de análise térmica para determinação de parâmetros cinéticos de compósitos de PU/fibra de curauá**. *Revista analytica*. N° 04, 2003.
- Rabelo, A. P. B. **Estudo e desenvolvimento de uma micro-coluna de campânulas pulsantes para a purificação de proteína**. Campinas: Faculdade Engenharia Química, Unicamp, 1999 (Tese de doutorado).
- Said e Pietro, R., **Enzimas de interesse industrial e Biotecnológico**. Editora Eventos, 2002
- Santos, S. A. **Efeito do tempo na composição físico-química, química e na atividade da bromelina do caule do abacaxizeiro *Ananas comosus (L) Merr. CV. Pérola armazenado em condições com e sem refrigeração***. Lavras: Ciências de Alimentos. Lavras: ESAL, p. 47, 1995 (Dissertação de mestrado). Wiseman, A. **Handbook of enzyme biotechnology**. 2. ed. New York: John Wiley Sons, 1987.