

# Condições de pH e temperatura para máxima atividade da bromelina do abacaxi (*Ananas Comosus* L. Merrill)

Moacyr Jorge Elias<sup>1\*</sup>, Ivan Fabian Arcuri<sup>1</sup> e Elias Basile Tambourgi<sup>2</sup>.

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

**RESUMO.** A bromelina, enzima presente no abacaxi, hidrolisa ligações peptídicas das proteínas; tem aplicação em diversas áreas envolvendo alimentos e medicina. Visando o aproveitamento da bromelina recuperada, a partir dos resíduos da industrialização do fruto (variedade pérola), foram pesquisadas condições de pH e temperatura para maior atividade, 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<sup>-1</sup> min.<sup>-1</sup> pela absorbância a 280 nm dos aminoácidos aromáticos gerados na hidrólise da caseína. Os ensaios foram efetuados em duplicata para duas relações enzima/substrato: 1/25 e 1/125 (em massa). Foi estabelecido um planejamento experimental em estrela tendo como ponto central pH em 7,0 e temperatura de 35°C. Os resultados foram tratados empregando o aplicativo computacional MINITAB 15 da Minitab Inc. que forneceu as equações do modelo e as superfícies de resposta. As equações foram tratadas matematicamente (cálculo diferencial), fornecendo gráficos da melhor atividade em função da temperatura. Observou-se perda da atividade enzimática com a elevação da temperatura para relação 1/25, atribuída à maior presença de enzima livre em comparação com a relação 1/125.

**Palavras-chave:** enzima, planejamento, decomposição térmica, proteinase, sulfidril protease.

**ABSTRACT. Temperature and pH conditions for maximum activity of bromelain extracted from pineapple (*Ananas Comosus* L. Merrill)** Bromelain, the enzyme found in pineapple, hydrolyzes proteins' peptide bonds, has several applications in the food industry and in medicine. Temperature and pH conditions for highest activity with casein as substrate were investigated from the bromelain recovered from industrialized pineapple ('pérola' variety) fruit residues. Extract was obtained by grinding fruit rind and its internal stem. The activity was expressed in mmol tyrosine L<sup>-1</sup> min.<sup>-1</sup> by absorbance at 280 nm of aromatic amino acids produced in casein hydrolysis. Assays were undertaken in duplicate for two enzyme/substrate with ratios: 1/25 and 1/125 (mass). Eight-pointed experimental design was undertaken with central value for pH at 7.0 and for temperature at 35°C. Experimental results were processed by MINITAB 15 (Minitab Inc) software which provided model's equations and surface responses. Equations were mathematically processed by differential calculus producing graphs which exhibit the best activities according to temperatures. Loss of enzyme activity was reported with temperature increase at 1/25 ratio, due to a higher free enzyme, when compared to 1/125 ratio.

**Keywords:** enzyme, planning, thermal decomposition, proteinase, sulphhydryl protease.

## Introdução

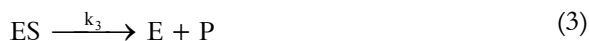
A bromelina pertence ao grupo de proteases, que tem a característica de hidrolisar ligações peptídicas das proteínas. Encontra-se presente no abacaxi (*Ananas comosus*), cujas enzimas são referidas de forma genérica como "bromelinas" (ROWAN, 2004). Como estão intimamente relacionadas é possível tratá-las como uma entidade única; substratos suscetíveis à bromelina incluem muitas proteínas comuns, como caseína, gelatina, colágeno,

globulinas e fibra muscular. A bromelina do abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill), existente no Brasil, é uma protease encontrada no fruto, talo, caule, folhas e raízes (FREIMAN; SABAA SRUR, 1999).

A bromelina tem aplicação em diversas áreas. Na indústria de alimentos pode ser usada para hidrolisar a miosina produzindo efeito de amaciamento da carne (OLIVEIRA, 2001). Na medicina foi demonstrado que a bromelina pode ser de interesse

para os cirurgões 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).

Com relação à desativação térmica da bromelina, as publicações consultadas (LI; LIN, 2001; YODOYA et al., 2003) referem-se a ela como sendo uma cinética de ordem um. A cinética da hidrólise de proteínas catalisada pela bromelina segue o mecanismo de Michaelis-Menten (HUNG et al., 2002; INOUE; NAGAI, 2004; KHAN et al., 2003), que envolve três etapas:



em que:

E, S e P são enzima, substrato (proteína) e produto, respectivamente, e ES o complexo que envolve a enzima e o substrato.  $k_1$ ,  $k_2$  e  $k_3$  são as constantes de velocidade da reação.

A bromelina pode ser obtida das diversas partes do abacaxizeiro. 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. A extração da bromelina por micelas reversas foi estudada por Hemavathi et al. (2007) e Umesh et al. (2008).

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de determinar as condições de maior atividade enzimática para a bromelina presente nos resíduos de industrialização do fruto, tomando como referência a bromelina pura.

## Material e métodos

A parte experimental foi efetuada nos laboratórios de pesquisa da Escola de Engenharia Mauá em São Caetano do Sul, Estado de São Paulo. O abacaxi foi adquirido no mercado local. 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 (5000 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 dispersões foram tamponadas com tampão fosfato (68 g  $KH_2PO_4$  + 87 g  $K_2HPO_4$  diluídos para 1 L) na proporção de 1 mL para cada 20 mL da dispersão de caseína ou de bromelina pura, e de 1 mL para cada 15 mL da dispersão do extrato dos resíduos do fruto. O pH foi ajustado para o valor desejado pela adição de solução de NaOH ou de HCl 1 M.

As reações de hidrólise da caseína foram efetuadas em reator (75 mL volume útil) em constante agitação. As relações enzima/substrato foram de 1/25 e de 1/125 (em massa), com a concentração de caseína de 13,333 g  $L^{-1}$  no reator, em ambos os casos. A quantidade de extrato do abacaxi foi previamente determinada como a necessária para fornecer a mesma atividade produzida nos ensaios com bromelina pura tomando como base o ponto central do planejamento experimental.

Após o tempo de reação de 10 min. foi pipetada uma amostra do meio reacional e adicionada em tubo de centrifuga contendo ácido tri cloro acético (TCA) 0,3 mol  $L^{-1}$ . A amostra foi centrifugada (5000 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 de tirosina  $L^{-1}$  empregando uma curva de calibração da concentração de tirosina pura (mmol  $L^{-1}$ ) em função da absorbância. Assim, a atividade enzimática foi expressa em mmol tirosina  $L^{-1} min^{-1}$ . Substâncias presentes na bromelina pura e na caseína que absorvem a 280 nm, porém não geradas pela hidrólise enzimática, 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, adicionada em TCA 0,3 mol  $L^{-1}$ , centrifugada e a absorbância do sobrenadante lida a 280 nm.

Pela literatura citada na introdução, os estudos que envolvem a bromelina referem-se ao pH em torno de 7 e temperaturas em torno de 35°C (exceto os trabalhos referentes à estabilidade térmica). Conforme Neto et al. (2002), foi elaborado um planejamento experimental em estrela tendo como ponto central pH = 7,0 e temperatura = 35°C para verificar como a atividade varia em função destes parâmetros. Os valores do pH e da temperatura foram codificados conforme apresentam as equações (4) e (5). A Tabela 1 apresenta o planejamento aplicado.

$$pH_{cd} = \frac{pH - 7,0}{1} \quad (4)$$

$$t_{cd} = \frac{t - 35,0}{10} \quad (5)$$

em que:

$pH_{cd}$  e  $t_{cd}$  são o pH e a temperatura codificadas, respectivamente.

Tabela 1. Conjunto de ensaios previstos para o planejamento.

Número de ensaios	$pH_{cd}$	$t_{cd}$	Valores para os ensaios	
			pH	t (°C)
1	0	$-\sqrt{2}$	7,0	21
1	-1	-1	6,0	25
1	1	-1	8,0	25
1	$-\sqrt{2}$	0	5,6	35
3	0	0	7,0	35
1	$-\sqrt{2}$	0	8,4	35
1	-1	1	6,0	45
1	1	1	8,0	45
1	0	$\sqrt{2}$	7,0	49

Para cada relação enzima/substrato o planejamento foi efetuado em duplicata. Os resultados obtidos para a atividade enzimática foram tratados empregando o aplicativo computacional MINITAB 15 da Minitab Inc., o qual fornece as constantes para a equação (6) que descreve a atividade em função das variáveis codificadas, bem como a superfície de resposta correspondente e os parâmetros para o cálculo do coeficiente de determinação do modelo.

$$A = b_0 + b_1 pH_{cd} + b_2 t_{cd} + b_{11} pH_{cd}^2 + b_{22} t_{cd}^2 + b_{12} pH_{cd} t_{cd} \quad (6)$$

em que:

A é a atividade,  $b_0$ ,  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $b_{11}$ ,  $b_{22}$  e  $b_{12}$  são as constantes.

### Resultados e discussão

A Tabela 2 apresenta os resultados encontrados para as constantes da equação (6) referentes aos ensaios para bromelina pura e para o fruto, acompanhados dos coeficientes de determinação do modelo.

Apesar de o tratamento estatístico, feito com nível de 95% de confiança, sugerir que os valores com significância na ordem de  $10^{-3}$  podem ser desconsiderados, decidiu-se mantê-los, uma vez que as superfícies de resposta obtidas são compatíveis com o esperado experimentalmente, conforme será discutido mais adiante. Os coeficientes de determinação  $R^2$  indicam que em todos os casos mais que 93% da variação é explicada pelo modelo; considerado satisfatório.

Tabela 2. Constantes da equação (6) e coeficientes de determinação do modelo.

	1 enzima/25 substratos		1 enzima/125 substratos	
	Bromelina pura	Extrato abacaxi	Bromelina pura	Extrato abacaxi
$b_0$	0,3369	0,3754	0,0690	0,0808
$b_1$	-0,0299	-0,0658	-0,0038	-0,0045
$b_2$	0,0653	0,1006	0,0396	0,0424
$b_{11}$	-0,0422	-0,0383	-0,0087	-0,0157
$b_{22}$	-0,0084	-0,0158	0,0069	0,0065
$b_{12}$	-0,0205	-0,0154	-0,0061	-0,0089
$R^2$ (*)	0,9357	0,9656	0,9582	0,9551

(\*)  $R^2$  é o coeficiente de determinação do modelo.

As Figuras 1 e 2 apresentam as superfícies de resposta para os ensaios empregando bromelina pura e para o extrato do fruto, ambas na relação 1 enzima/25 substratos, e as Figuras 3 e 4 as superfícies de resposta para a relação 1/125.

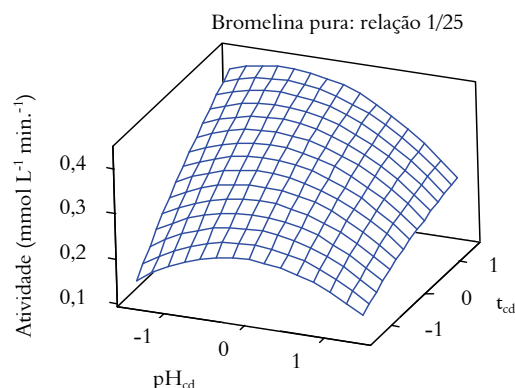


Figura 1. Superfície de resposta para a relação 1 bromelina/25 substratos.

Para dada temperatura codificada  $t_{cd}$  constante, um plano paralelo ao plano definido pelos eixos da atividade e do  $pH_{cd}$  corta a superfície de resposta resultando em uma curva da atividade em função do  $pH_{cd}$ . Derivando a equação (6) com relação ao  $pH_{cd}$  para dada  $t_{cd}$  constante, obtém-se a derivada da referida curva (equação 7).

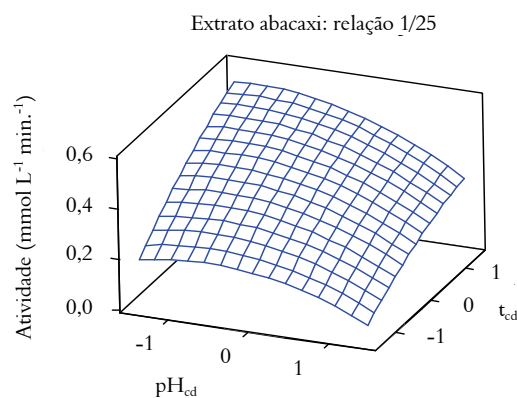
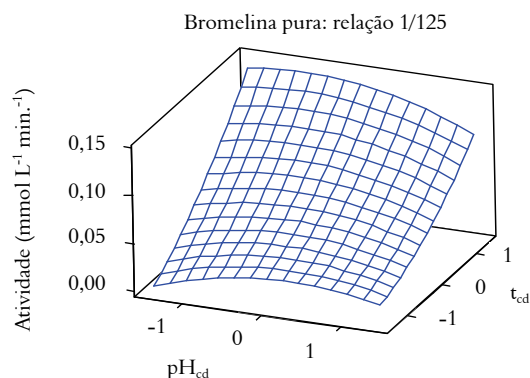
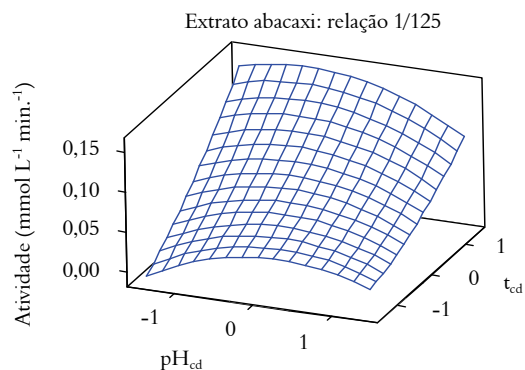


Figura 2. Superfícies de resposta para a relação 1 extrato abacaxi/25 substratos.

$$\left( \frac{dA}{d\text{pH}_{\text{cd}}} \right)_{\text{constante } t_{\text{cd}}} = b_1 + 2b_{11}\text{pH}_{\text{cd}} + b_{12}t_{\text{cd}} \quad (7)$$



**Figura 3.** Superfície de resposta para a relação 1 enzima/125 substratos.



**Figura 4.** Superfície de resposta para a relação 1 extrato abacaxi/125 substratos.

Igualando a equação (7) a zero, obtém-se a equação (8), que define o  $(\text{pH}_{\text{cd}})_{\text{ótimo}}$  correspondente à máxima atividade para dada  $t_{\text{cd}}$  constante.

$$(\text{pH}_{\text{cd}})_{\text{ótimo}} = \frac{-b_1 - b_{12}t_{\text{cd}}}{2b_{11}} \quad (8)$$

Substituindo a equação (8) na equação (6) e fazendo as transformações algébricas adequadas, obtém-se a equação (9) que corresponde à atividade ótima em função de  $t_{\text{cd}}$ , tendo implícito o  $(\text{pH}_{\text{cd}})_{\text{ótimo}}$ .

$$A_{\text{ótima}} = B_0 + B_1t_{\text{cd}} + B_2t_{\text{cd}}^2 \quad (9)$$

em que:

$A_{\text{ótima}}$  é a atividade ótima,  $B_0$ ,  $B_1$  e  $B_2$  são as constantes resultantes do desenvolvimento algébrico.

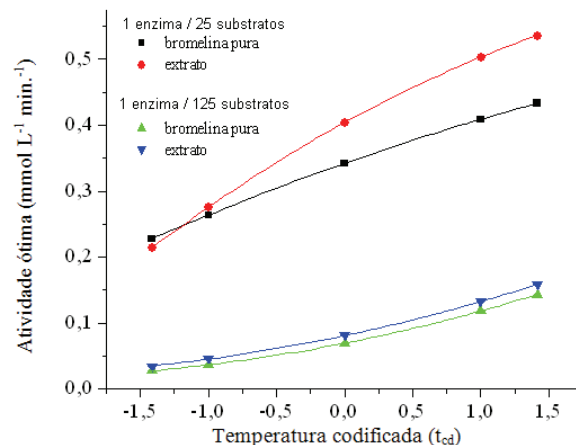
A Tabela 3 apresenta os valores encontrados de  $B_0$ ,  $B_1$  e  $B_2$  para a equação (9).

**Tabela 3.** Constantes da equação (9).

	1 enzima/25 substratos		1 enzima/125 substratos	
	Bromelina pura	Extrato resíduo	Bromelina pura	Extrato resíduo
$B_0$	0,3423	0,4037	0,0694	0,0811
$B_1$	0,0726	0,1138	0,0409	0,0437
$B_2$	-0,0060	-0,0143	0,0080	0,0078

Os valores na ordem de  $10^{-3}$  são os coeficientes de  $t_{\text{cd}}^2$ ; apesar de pequena significância, eles são os responsáveis por mostrar a tendência de taxa de aumento decrescente da atividade com a temperatura para a relação 1 enzima/25 substratos, e a tendência de taxa de aumento crescente da atividade com a temperatura para a relação 1 enzima/125 substratos.

A partir da equação (9) e dos valores da Tabela 3, foram construídos os gráficos da atividade ótima em função da temperatura codificada  $t_{\text{cd}}$ . A Figura 5 apresenta as curvas obtidas.



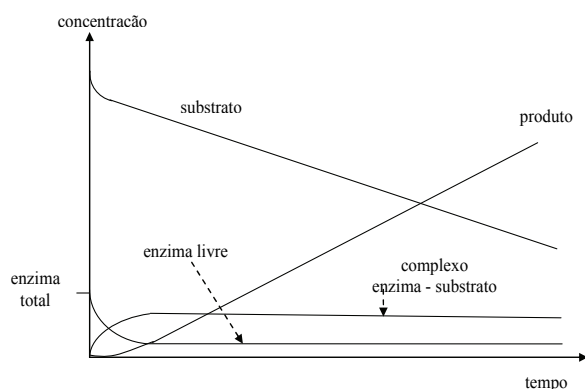
**Figura 5.** Atividade ótima em função da temperatura codificada

Para a relação 1 enzima/25 substratos observa-se maior atividade em função da temperatura para o extrato; nos dois casos observa-se uma taxa de aumento decrescente com a temperatura. Para a relação 1/125 as duas curvas foram praticamente coincidentes mostrando que a taxa de aumento da atividade aumenta com o aumento da temperatura; o que é esperado considerando que a constante de velocidade de decomposição do complexo enzima-substrato (equação 3) aumenta com a temperatura.

Para a relação 1 enzima/25 substratos a constante  $B_2$  é negativa, o que corresponde a uma taxa de aumento decrescente da atividade com a temperatura, comportamento inverso ao da relação 1 enzima/125 substratos; notam-se estas tendências pela observação da Figura 5. A tendência apresentada pela relação 1/25 pode ser explicada pela desativação

térmica da enzima (atividade aumenta com a temperatura pelo aumento da velocidade de hidrólise, enquanto que diminui pela desativação térmica). Para a relação 1 enzima/125 substratos é teoricamente esperado que este fenômeno venha a acontecer em temperaturas maiores do que aquelas ensaiadas.

A discussão sobre o comportamento para a relação 1/25 encontra apoio quando se considera o modelo de ação enzimática pseudo-estacionário (SEGEL, 1993), com base na sequência de reações apresentadas pelas equações (1), (2) e (3). Neste modelo, a maior parte da enzima combina-se com o substrato formando um complexo intermediário, restando a presença de enzima livre, a Figura 6 ilustra este comportamento.



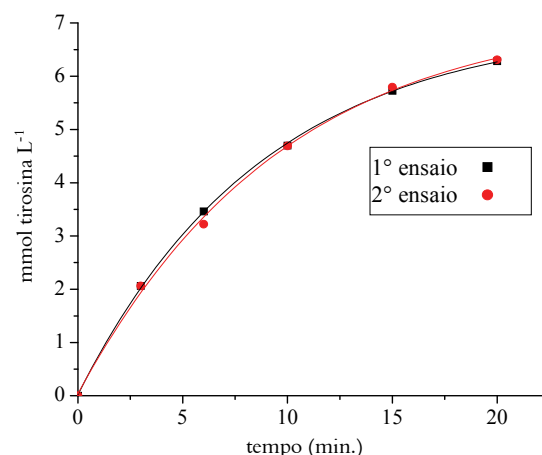
Fonte: adaptado de SEGEL (1993).

**Figura 6.** Concentrações ao longo do tempo: estado pseudo-estacionário.

Considerando que a concentração de substrato foi a mesma para as duas relações estudadas, a enzima livre está presente em menor quantidade nos ensaios referentes à relação 1/125, do que nos ensaios referentes à relação 1/25. Como para a relação 1/25 observa-se a tendência da atividade não aumentar com a temperatura da mesma forma como ocorre para a outra relação, pode-se entender que a enzima, combinada com o substrato (complexo enzima-substrato), é menos suscetível à desativação térmica. Em outras palavras, a enzima livre é mais suscetível à desativação térmica do que quando combinada com o substrato e, por estar presente em maior quantidade na relação enzima/substrato 1/25, o gráfico da atividade em função da temperatura mostra uma taxa de aumento decrescente. Estas considerações encontram apoio no trabalho de Ko e Kang (1990).

Resta considerar se a taxa de aumento decrescente da atividade observada para a relação 1/25 não seria pela caseína ter sido já quase que

totalmente consumida, isto é, nas condições do planejamento experimental na temperatura  $t_{cd} > 0$  os 10 min. de tempo de teste da atividade terem sido suficientes para hidrolisar a caseína quase que totalmente, o que resultaria na atividade decrescente pela falta de substrato, e não pela desativação térmica da enzima. Para dirimir esta dúvida, foi realizado um teste em duplicata no ponto de maior temperatura previsto pelo planejamento experimental ( $pH_{cd} = 0$  e  $t_{cd} = +\sqrt{2}$ ), avaliando a hidrólise da caseína ao longo de 20 min., cujos resultados encontram-se na Figura 7, em que nota-se que após 10 min. de reação há ainda quantidade apreciável de caseína, significando que as concentrações do complexo enzima - substrato e da enzima livre correspondem à região do patamar apresentado na Figura 4 (estado pseudo-estacionário). Portanto, a taxa de aumento decrescente da atividade observada para a relação 1/25 não se deve à falta de substrato.



**Figura 7.** Formação de aminoácidos aromáticos na hidrólise da caseína (bromelina pura 1/25; 49°C e pH 7,0).

## Conclusão

A bromelina pura e a encontrada na casca e no talo do abacaxi apresentaram o mesmo comportamento: maior proporção de enzima livre encontrada na relação 1 enzima/25 substrato resulta na sua maior perda por desativação térmica; para a relação 1/125, em que a maior parte da enzima está combinada com o substrato, a taxa de aumento da atividade aumenta com a temperatura. Conclui-se que a enzima, na forma de complexo intermediário, é protegida contra a desativação térmica.

Como a bromelina encontrada no abacaxi pode ser considerada igual à pura, sua aplicação é indicada às diversas áreas envolvendo alimentos e medicina.

## 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 do trabalho experimental.

## Referências

- 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.) Merrill). **Ciência 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. Merrill. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, n. 11, p. 985-992, 2007.
- HUNG, T. H.; CHANG, Y. M.; SUNG, H. Y.; CHANG, C. T. Purification and characterization of hydrolase with chitinase and chitosanase activity from commercial stem bromelain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 16, p. 4666-4673, 2002.
- INOUE, K.; NAGAI, K. A novel and convenient assay method for proteinase activity by measuring turbidity change in proteolytic digestion of soy protein isolates. **Daizu Tanpakushitsu Kenkyu**, v. 7, p. 48-51, 2004.
- KHAN, R. H.; RASHEEDI, S.; HAQ, S. K. Effect of pH, temperature and alcohols on the stability of glycosylated and deglycosylated stem bromelain. **Journal of Biosciences**, v. 28, n. 6, p. 709-714, 2003.
- KO, Y. H.; KANG, Y. J. Isolation and partial characterization of proteolytic enzymes from stems of pineapples cultivated in Cheju Island. **Nonmunjip – Cheju Taehakkyo, Chayon Kwahakpyon**, v. 31, n. 18, p. 137-42, 1990.
- LI, X.; LIN, Z. Effect of carboxyl  $\text{Ca}^{2+}$ , and  $\text{Zn}^{2+}$  on bromelain thermal stability. **Yaowu Shengwu Jishu**, v. 8, n. 6, p. 339-341, 2001.
- NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos** – Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2002.
- OLIVEIRA, L. F. Advantages of bromelain use in food processing and medicine. **Alimentos e Nutrição**, v. 12, n. 4, p. 215-226, 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. London: Elsevier, 2004.
- SEGEL, I. H. **Enzyme kinetics**. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems. New York: John Wiley and Sons, 1993.
- 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 ( $\gamma$ -methyl-L-glutamate/L-leucine) beads. **European Polymer Journal**, v. 39, n. 1, p. 173-180, 2003.

Received on August 12, 2009.

Accepted on June 29, 2010.

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.