

Determinação do teor de proteínas totais e da atividade proteolítica de resíduos agroindustriais do processamento de frutos do abacaxizeiro (*Ananas comosus* var. *comosus*) cv. Pérola

P. C. Lopes; E.K.R Pinto; M. S. Mattar; H. B. Costa

¹Laboratório de Bromatologia- Faculdade Católica Salesiana do Espírito Santo. Av. Vitória, 950. Vitória-ES

hcosta@catolica-es.edu.br

(Recebido em 06 de março de 2013; aceito em 10 de julho de 2013)

Resumo: Com a crescente demanda do agronegócio brasileiro ocorre também aumento na geração de grande quantidade de resíduos agroindustriais oriundos dos processamentos dos alimentos. Nesse contexto, podemos citar o abacaxi, o qual apenas o fruto é comercializado e o restante é considerado resíduo agrícola e, portanto, inutilizado. Este trabalho objetivou a determinação do valor do teor de proteínas totais (TPT), atividade proteolítica (AP) e específica (AE) dos resíduos do abacaxi da cultivar 'Pérola'. Os extratos foram obtidos pela trituração da casca e da coroa em três diferentes soluções tampão: acetato pH 4 e pH 5 e fosfato pH 7. A AE foi determinada pela relação entre AP e TPT. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias seguidas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Em relação à AE na casca, o tampão acetato pH 4 mostrou valor elevado (441,1836 U/ml) comparado aos demais tampões, enquanto os tampões acetato pH 5 e fosfato pH 7 não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre eles (298,2598 U/ml; 314,0844 U/ml, respectivamente). Na AE da coroa, ambos os tampões, acetato pH 4 (317,9444 U/ml) e pH 5 (324,8039 U/ml) apresentaram resultados superiores ao fosfato pH 7 (143,0445 U/ml). Logo, e considerando que na AE da coroa os tampões acetato pH 4 e pH 5 não tiveram diferenças estatísticas significativas entre eles, conclui-se que o tampão acetato pH 4 é o melhor na extração de enzimas proteolítica em ambos os resíduos.

Palavras-chave: abacaxi; fitoterápia; tampão

Determination of content protein and Proteolytic activity of pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*) agroindustrial waste

Abstract: Increasing demand for Brazilian agribusiness, no generation of large amounts of waste from the agroindustria processing. In this context, we can mention the pineapple, which only the fruit is sold, the remainder is considered agricultural waste being discarded. This study aimed to evaluate the value of total protein (VPT), activity proteolytic (AP) and specific (SA) waste pineapple cultivar 'Perola'. The extracts were obtained by crushing the peel and crown in three different buffer solutions: acetate pH 4 and pH 5 and pH 7 phosphate. The SA was carried out by the ratio between PA and TPT. Results were subjected to analysis of variance (ANOVA), and medium followed by the Tukey test ($p < 0.05$). In relation of SA peel, acetate buffer pH 4 showed high value (441.1836 U / ml) compared to other buffer, while acetate buffer pH 5 and pH 7 phosphate not showed statistically significant differences between them (298.2598 U / ml; 314.0844 U / ml, respectively). In SA crown, both buffers, acetate pH 4 (317.9444 U / ml) and pH 5 (324.8039 U / ml) showed better results than the phosphate pH 7 (143.0445 U / ml). Therefore and considering that SA in crown the buffer acetate pH 4 and pH 5 had not statistically significant differences between them, it is concluded that pH 4 acetate buffer is the best extraction of proteolytic enzymes in both residues.

Keywords: pineapple; phytotherapy; buffer

1. INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta sua economia baseada principalmente no agronegócio. Devido a crescente demanda deste setor, há geração de grande quantidade de resíduos agroindustriais oriundos dos processamentos dos alimentos. Muitas vezes, esses resíduos representam um grande problema, pois são descartados no meio ambiente. No entanto, muitos deles são ricos em compostos bioativos, reconhecidos por aplicações tecnológicas, representando fontes naturais destas substâncias¹

Nesse contexto, podemos citar o abacaxi, que é composto por caule, raiz, casca, folha e fruto, porém apresenta apenas o fruto como parte comercializada da planta. O restante é considerado resíduo agrícola e não é utilizado adequadamente².

Consumido em todo mundo, o abacaxi é cultivado em regiões tropicais e subtropicais². O Brasil é um dos maiores produtores mundiais, sendo as principais áreas produtoras o nordeste do país, embora seja cultivada em todo território brasileiro³. No Espírito Santo predomina a agricultura familiar, principalmente na região sul-litorânea e na região norte, consistindo em um dos principais estados produtores de abacaxi.

O abacaxi (*Ananas comosus*) é a principal fonte de uma enzima proteolítica, a bromelina, encontrada no caule, folhas, raízes e no fruto e em outras espécies da família Bromeliaceae⁴. Tanto *in vivo*, quanto *in vitro* a bromelina possui propriedades anti-inflamatória, antifúngica, anti-edematoso, antitrombótico e atividade fibrinolítica³.

A importância econômica desta enzima está diretamente ligada a sua utilização em diversas indústrias, tais como indústria alimentícia para o amaciamento de carnes e clarificação de cervejas; para amaciamento de fibras na indústria têxtil; e, farmacêutica para produção de fármacos^{4,5}.

De acordo com Costa, Fernandes e Ventura (2008), nas últimas décadas houve um crescente interesse em novos processos biotecnológicos e com o aumento da utilização da bromelina ligada a esses processos ampliou-se a importância de se estudar meios viáveis de extração dessas enzimas proteolíticas mantendo sua atividade.

A cultivar Pérola é uma das espécies mais comercializadas no Brasil. E apesar do abacaxizeiro ser amplamente cultivado em várias regiões do país, trata-se de uma cultivar bastante exigente no que se refere à quantidade de nutrientes vegetais produzidos. Esta pode apresentar um alto conteúdo da enzima bromelina, porém são poucos os estudos que comprovem e informem as características desta enzima para esta cultivar. Grandes diferenças entre as quantidades extraídas de nutrientes devem ser levadas em conta perante as condições variáveis apresentadas por esta variedade no que diz respeito as formas de cultivo empregadas e ao tipo de tampão utilizado para extração de bromelina³.

Assim, o presente trabalho objetivou determinar o teor de proteínas totais, atividade proteolítica e atividade específica dos resíduos agroindustriais do abacaxi, uma vez que esses resíduos atualmente não tem destino e podem ser utilizados como fontes de bromelina, comparando diferentes tipos de tampões na extração.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção e tratamento da matéria-prima

A casca e a coroa foram obtidas a partir da cultivar 'Pérola'. Os frutos da cv. Pérola foram adquiridos em feiras e supermercados da região da Grande Vitória. Após a coleta dos frutos, os característicos resíduos agroindustriais (casca e coroa) foram lavados com hipoclorito e armazenados para as análises futuras.

2.2 Escolha da solução de extração

Os extratos protéicos foram obtidos pela trituração da casca e da coroa na proporção 1:3 (1 g de amostra para 3 mL da solução extratora) em três diferentes soluções de extração: tampão acetato pH 4,0; tampão acetato pH 5,0 e tampão fosfato pH 7,0. Em seguida, os extratos foram filtrados em gaze e centrifugados a 2.000 rpm por 50 minutos.

2.3 Determinação do teor de proteínas totais

Foram colocados 100 µl do extrato protéico com 5 ml do reagente de Bradford em um tubo de ensaio. Em seguida, os tubos foram homogeneizados, mantendo em repouso por 5 minutos. Procedeu-se com a leitura das soluções em espectrofotômetro a 595 nm. Foram preparadas cinco soluções de

padrão de caseína com diferentes concentrações (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mg/ml de proteína), obtendo assim a curva padrão, estabelecendo a relação de absorvância e quantidade de proteínas.

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente, por meio de análise de regressão linear, foi calculado o coeficiente de determinação (R^2) e a equação da reta, possibilitando estimar os valores da curva padrão⁶.

2.4 Determinação da atividade proteolítica

O tubo teste consiste na associação de 5 ml de solução de caseína, 0,2 ml de solução de L-cisteína e 0,8 ml de extrato enzimático. Esses tubos foram colocados em banho-maria por 10 minutos a 37 °C, em sequência foram adicionados 5 ml de solução do precipitante protéico e retornados ao banho-maria 37 °C por 30 minutos. Após resfriados em temperatura ambiente, essa solução contida no tubo foi filtrada e se procedeu à leitura da absorvância no espectrofotômetro a 280 nm de comprimento de onda.

O branco consistiu na colocação de 5 ml de solução de caseína, 0,2 ml de solução de L-cisteína, 0,8 ml de água destilada e 5 ml de solução do precipitante protéico. Esses tubos foram colocados em banho-maria a 37 °C por 10 minutos e ao término as soluções foram deixadas em temperatura ambiente. As soluções então foram filtradas e à leitura da absorvância no mesmo espectrofotômetro em mesmo comprimento de onda utilizado no tubo teste foi efetuada.

Em seguida foi preparada uma solução de tirosina 50 µg/ml e foi realizada a leitura da absorvância a 280 nm.

Os resultados encontrados nas absorvâncias para os tubos testes, brancos e para solução de tirosina foram colocados na fórmula que segue para calcular unidade por ml (U/ml) (1) [7].

$$\frac{U}{ml} \text{ de enzima} = \frac{At - Ab}{A_{\text{tirosina}}} \times \frac{\mu\text{mol tirosina} \times V_2}{V_1} \quad (1)$$

Sendo:

At: absorvância do tubo teste

Ab: absorvância do tubo branco

A_{tirosina} : absorvância da tirosina

µmol tirosina: concentração da solução de tirosina na cubeta

V_1 : volume colocado no tubo do extrato enzimático

V_2 : volume usado no experimento

2.4.1 Determinação da Atividade Específica

A atividade específica das enzimas proteolíticas foi determinada por uma relação existente entre atividade proteolítica em U/ml por teor protéico em mg/ml (2).

$$\text{Atividade Específica} = \frac{\text{Atividade Proteolítica} \left(\frac{U}{ml}\right)}{\text{Teor Protéico} \left(\frac{mg}{ml}\right)} \quad (2)$$

3. RESULTADOS

3.1 Teor de proteínas totais, Atividade proteolítica e atividade específica da bromelina presente na casca

No teor de proteínas totais os tampões acetato pH 4 e pH 5 apresentaram valores de 0,0562 mg/ml e 0,0835mg/ml respectivamente, enquanto o tampão fosfato pH 7 destacou-se pelo elevado valor, 0,1129 mg/ml. Mostrando diferenças estatísticas entre os três tampões (Tabela 1).

Na atividade proteolítica, os tampões acetato pH 4 e pH 5 não mostraram diferenças estatísticas (24,7933 U/ml e 24,8966 U/ml respectivamente), enquanto que o tampão fosfato pH 7 apresentou diferenças estatísticas significativas entre eles, por mostrar valor superior a eles (35,4633 U/ml) (Tabela 1).

A atividade específica de enzimas proteolíticas em tampão acetato pH 4 (441,1836 U/mg) foi maior do que acetato pH 5 (298,2598 U/mg) e fosfato pH 7 (314,0844 U/mg), sendo que os tampões acetato pH 5 e fosfato pH 7 não diferiram estatisticamente entre eles e o tampão pH 4 diferiu estatisticamente entre o tampão pH 5 e fosfato pH 7 (Tabela 1).

Tabela 1: Valores de proteínas totais, atividades proteolíticas e específica da casca obtidos em diferentes tampões de extração

Tampões de extração	Proteínas totais (mg/ml)	Atividade Proteolítica (U/ml)	Atividade Específica (U/mg)
Tampão Acetato pH 4	0,0562 ^a	24,7933 ^a	441,1836 ^a
Tampão Acetato pH 5	0,0835 ^b	24,8966 ^a	298,2598 ^b
Tampão fosfato pH 7	0,1129 ^c	35,4633 ^b	314,0844 ^{b,c}

Médias de três repetições. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey.

3.2 Teor de proteínas totais, Atividade proteolítica e atividade específica da bromelina presente na coroa

O tampão fosfato pH 7 (0,1605 mg/ml) manteve os valores elevados no teor de proteínas, e os três tampões difeririam estatisticamente entre si.

Na atividade proteolítica os tampões fosfato pH 7 (22,9033 U/ml) e acetato pH 5 (23,8766 U/ml) apresentaram resultados superiores ao tampão acetato pH 4 (19,0766 U/ml), por ter mostrado diferença estatísticas significativas entre o acetato pH 5 e fosfato pH 7, sendo que estes dois não apresentaram diferenças estatísticas entre eles.

Na atividade específica os tampões acetato pH 4 e pH 5 mostraram valores elevados (317,9444 e 324,8039 U/ml, respectivamente), em comparação com fosfato pH7 (143,0445 U / ml) que diferiu estatisticamente dos outros dois tampões, enquanto que o tampão acetato pH 4 e pH 5 não diferiram estatisticamente entre eles (Tabela 2).

Tabela 2: Valores de proteínas totais, atividades proteolíticas e específica da coroa obtidos em diferentes tampões de extração

Tampões de extração	Proteínas totais (mg/ml)	Atividade Proteolítica (U/ml)	Atividade Específica (U/mg)
Tampão Acetato pH 4	0,0600 ^a	19,0766 ^a	317,9444 ^a
Tampão Acetato pH 5	0,0737 ^b	23,8766 ^b	324,8039 ^a
Tampão fosfato pH 7	0,1605 ^c	22,9033 ^{b,c}	143,0445 ^b

Médias de três repetições. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey.

4. DISCUSSÃO

A bromelina é obtida comercialmente do caule do abacaxi e a quantidade produzida não é suficiente para suprir as necessidades do mercado, elevando o seu valor comercial e além disso não é produzida no Brasil⁸.

Assim, os resultados indicam que não somente o caule, mas a casca e a coroa podem ser utilizadas para a obtenção de bromelina, tornando-se, dessa forma, disponível outra fonte de obtenção dessa enzima para as empresas que a utilizam em seus processos produtivos, tais como as indústrias farmacêuticas que a aplicam na produção de fármacos, e as indústrias alimentícias para fabricação de queijos, que necessitam de extratos puros e semi-puros dessa enzima [4, 5]

Os resultados indicam ainda que o tampão acetato pH 4 pode ser utilizado para extração e posterior purificação de bromelina em ambos os resíduos, pois foi o tampão que extraiu mantendo os valores de atividade específica mais elevado comparado aos outros tampões (441,1836 U/mg na casca e 317,944U/mg na coroa). Apesar do tampão pH 7 extrair maior quantidade de proteínas totais e atividade proteolítica, ele deixa de ser interessante pois reduz a atividade específica de bromelina. Isso pode estar acontecendo pela alta concentração de proteínas totais, que o tampão pH 7 está extraíndo e essas proteínas extraídas são diferentes de bromelina, e com isso está diluindo o teor da enzima no extrato proteico reduzindo sua atividade específica.

5. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados, tanto a casca quanto a coroa podem ser utilizados para obtenção de enzimas proteolíticas.

Na casca, os melhores valores de proteínas totais e atividade proteolítica foram obtidos em tampão fosfato pH 7. No entanto, na atividade específica, o tampão acetato pH 4 obteve resultado maior comparado aos outros tampões.

O melhor resultado encontrado no teor de proteínas na coroa foi obtido também com a utilização de tampão fosfato pH 7. Na atividade proteolítica valores satisfatórios foram encontrados com uso dos tampões fosfato pH 7 e acetato pH 5. Entretanto, na atividade específica os melhores resultados foram obtidos após o uso dos tampões acetato pH 4 e pH 5.

Considerando que na atividade específica da coroa os tampões acetato pH 4 e pH 5 não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre eles, conclui-se que o tampão acetato pH 4 é o melhor na extração de enzimas proteolíticas em ambos os resíduos.

Por fim, a utilização desses rejeitos agroindustriais para a extração de bromelina, levaria a uma redução da quantidade de resíduos gerados pelas indústrias que usam apenas a polpa do abacaxi.

-
1. ALBUQUERQUE, C. Resíduos de Valor. São Paulo: 2009. Disponível em: <www.esalq.usp.br >
 2. ABILIO, G. M. F.; HOLSCHUH, H. J.; BORA, P. S.; OLIVEIRA, E. F. Extração, atividade da bromelina e análise de alguns parâmetros químicos em cultivares de abacaxi. Rev. Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 31, n. 4, p. 1117-1121,(2009).
 3. SOARES, P.; COELHO, D.; MAZZOLA, P.; SILVEIRA, E.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; PESSOA, A.; TAMBOURGI, E. Studies on bromelain precipitation by ethanol, poly (ethylene glycol) and ammonium sulphate. In: The Tenth International Conference on Chemical and Process Engineering, 2011, Florence. Resumo The Tenth International Conference on Chemical and Process Engineering, 2011.
 4. FRANÇA-SANTOS, A.; ALVES, R. S.; LEITE, N. S.; FERNANDES; R. P. M. Estudos bioquímicos da enzima bromelina do *Ananas comosus* (abacaxi). Rev. Scientia Plena, São Cristóvão, v. 5, n. 11, p. 1-6, (2009).
 5. COSTA, H. B. ; FERNANDES, P. M. B.; VENTURA, J. A. Extração, Purificação parcial e Comparação de duas técnicas de precipitação de enzimas proteolíticas do abacaxizeiro. In: XX Congresso Brasileiro de Fruticultura 54th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture, 1.,2008, Vitória. Anais... Vitória: Incaper, 2008. Disponível em: <http://200.137.78.15/cd_XXCBF/paginas/Biotecnologia/20080726_101835.pdf> Acesso em: 23 ago. 2012.
 6. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, v. 72, p. 248-254, (1976).
 7. DEPEAU, G. R. Methods in Enzimology. V. 45. New York. Academic Press, (1976).

-
8. PIZA, I. M. T.; LIMA, G. P. P.; BRASIL, O. G.; PIZA, P. L. B. T. Atividade da enzima bromelina em plantas de Abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill), sob condições de salinidade “in vitro”. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu, v. 5, n. 1, p. 68-74, (2002).