

Estudos bioquímicos da enzima bromelina do *Ananas comosus* (abacaxi)

A. França-Santos ; R. S. Alves ; N. S. Leite ; R. P. M. Fernandes

Laboratório de Enzimologia – Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000,
São Cristóvão-SE, Brasil
alexanderfrostster@hotmail.com

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

O presente trabalho objetivou a determinação da atividade da enzima bromelina no abacaxi *Ananas comosus* cv. Pérola em condições *in vivo* e *in natura* e a caracterização bioquímica dessa enzima largamente utilizada nas indústrias farmacêuticas e de alimentos. A atividade proteolítica foi determinada pela digestão do substrato caseína usando o método de Kunitz (1947). Maior atividade foi observada para a bromelina extraído do fruto do abacaxi quando comparada as folhas do abacaxizeiro cultivado *in natura* sob condição hidropônica. A variação da atividade proteolítica devido ao pH e temperatura foi determinada nos pHs entre 4,0 e 9,0, e nas temperaturas entre 20°C e 70°C. A bromelina apresentou pH ótimo de ação 5,0 em tampão acetato de sódio e temperatura ótima de 40°C.

Palavras chave: caracterização bioquímica, protease vegetal, abacaxi, Kunitz, cv. Pérola

This study aimed to determine bromelain enzymatic activity of the enzyme pineapple *Ananas comosus* cv. Pérola in both *in vivo* and *in natura* conditions and partial biochemical characterization of this enzyme that is widely used in pharmaceutical and food industries. The proteolytic activity was measured by digestion of casein by the Kunitz (1947) method. Higher activity was observed for bromelain extracted from pineapple fruits when compared to leaves of pineapple cultured *in natura* under hydroponic condition. The variation in proteolytic activity due to pH and temperature was determined at pHs between 4.0 to 9.0, and temperatures between 20°C to 70°C. Bromelain showed optimum pH of action 5.0 in sodium acetate buffer and optimum temperature of 40°C.

Keywords: biochemical characterization, plant protease, pineapple, Kunitz, cv Pérola

1. INTRODUÇÃO

O abacaxi (*Ananas comosus*) é uma espécie frutífera de grande importância econômica e social cultivada em mais de 70 países de clima tropical e subtropical. A participação brasileira de produtos de abacaxi no mercado externo ainda é bastante reduzida, concentrando-se, basicamente, os seus envios para países como Itália, Alemanha e Países Baixos [1]. Além do *A. comosus* todas as outras espécies de *Ananas* são encontradas no Brasil, sendo este país um dos principais centros de diversidade genética [2]. As excelentes características qualitativas do fruto abacaxizeiro refletem na sua importância sócio-econômica [3].

O abacaxi é a principal fonte da enzima proteolítica bromelina (EC 3.4.22.4) sendo este um nome genérico dado ao conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nos vegetais da família Bromeliaceae, da qual o abacaxi é o mais conhecido. A bromelina é encontrada no caule, folhas, raízes e no fruto do abacaxi (*A. comosus*) e em todas as espécies da família Bromeliaceae. No entanto, sua produção ainda é pequena comparada às necessidades do mercado, tornando-se um produto oneroso devido ao alto valor comercial, por não ser produzido no Brasil [4].

A bromelina tem diversos usos, todos baseados em sua atividade proteolítica. A sua importância econômica está relacionada com a produção de fármacos e a sua utilização na indústria alimentícia (na clarificação de cervejas, na fabricação de queijos, no amaciamento de carnes, no preparo de alimentos infantis e dietéticos, entre outros), no tratamento de distúrbios, digestivos, feridas e inflamações, preparo de colágenos hidrolisados, nas indústrias têxteis, para amaciamento de fibras e também na produção de detergentes [5].

A bromelina é uma enzima proteolítica da classe das hidrolases. As proteases são hidrolases capazes de romper a ligação peptídica das proteínas e peptídeos. A especificidade das proteases é ampla e classificada de acordo com a constituição de seu sítio ativo em três grupos principais:

serina protease, ácido aspártico protease e cisteína protease, sendo que a bromelina se enquadra neste último grupo [6].

A enzima bromelina vem sendo amplamente caracterizada. A bromelina do fruto tem uma atividade proteolítica maior que a bromelina do talo em diversos substratos protéicos, e sua atividade é máxima em pH 8,0 e temperatura de 70°C. A bromelina do talo apresentou atividade máxima a 60°C e pH 7,0 [7].

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 [8]. 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 [9].

Um dos processos analisados e que proporciona a multiplicação de diferentes espécies para obter resultados satisfatórios é o cultivo *in natura*. A técnica de micropropagação pode ser utilizada como alternativa para a produção em grande escala de material vegetal de abacaxizeiro visando à exploração comercial da enzima em questão. Porém, o cultivo *in natura* resultou em baixa atividade proteolítica quando comparado ao abacaxi cultivado *in vivo*. Por esse motivo o presente trabalho realizou estudos de caracterização bioquímica da bromelina extraída do fruto do abacaxizeiro cv. Pérola.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a análise *in natura* da bromelina foram utilizadas 150 brotações de abacaxizeiro cv. Pérola, provenientes do terceiro subcultivo *in natura*, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos com 15 repetições, sendo cada parcela experimental composta por duas brotações. As brotações com altura de 4cm, foram fixadas em placas de isopor com orifícios de 2cm de diâmetro em espaçamento de 5 x 3cm, em bandeja plástica com 42cm de comprimento x 26cm de largura x 6cm de altura, cada bandeja contendo 450 mL de solução de água, MS [10], ½ MS, Hoagland [11], ½ Hoagland e Fertilizante Foliar (NIFOL) correspondente ao seu tratamento. Após um período de dois meses sob aeração com soluções específicas, foram realizadas as análises bioquímicas.

Para a análise *in vivo* foi utilizado o extrato bruto do fruto do abacaxi. Dois abacaxis cv. Pérola foram comprados no Mercado Municipal de Aracaju e descascados para que toda a polpa fosse utilizada. Foi obtida uma massa total de 860g de polpa. Estas foram maceradas obtendo o suco que foi filtrado em uma camada de algodão. Após essa filtração, o volume obtido foi de 480mL.

A determinação da concentração de proteínas totais foi realizada pelo Método de Bradford utilizando uma curva padrão de albumina do soro bovino (BSA) [12].

Para a determinação da atividade proteolítica da enzima, foi utilizado o método da digestão da caseína [13]. A solução tamponada de caseína foi preparada pela dissolução de 1g de caseína em aproximadamente 35ml de água destilada e 5ml de hidróxido de sódio 1M sob constante agitação até que obteve-se a completa dissolução da caseína. Em seguida, foi adicionado tampão fosfato a 1M pH 7,5. Em um tubo de ensaio adicionou-se 5mL de caseína e 0,2mL do extrato protéico (suco do abacaxi e extrato de folhas) sob constante agitação. Em seguida, retirou-se uma alíquota de 0,02mL do volume reacional (Branco). A esta alíquota era adicionado 0,98mL de água destilada e 1mL do reagente de Bradford [12], após 5 min realizava-se a leitura da absorvância em espectrofotômetro a 595nm. Após 20 minutos a operação era repetida

Para realização do cálculo na determinação da atividade enzimática, foi utilizada a seguinte equação:

$$A_{ENZ} = \frac{(((Abs_{inicial} - Abs_{final}) - C_{lin}) / C_{ang}) \cdot d \cdot V_{tubo}}{MM_{PD} \cdot t_1 \cdot V} \quad (1)$$

Onde A_{ENZ} é a atividade enzimática [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$] ou [$\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$], d é o fator de diluição (volume total/volume da alíquota), MM_{PD} a massa molar do substrato utilizado [$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$], V o volume da amostra [mL], V_{tubo} o volume reacional [mL], $Abs_{inicial}$ e Abs_{final} são as leituras inicial e final de absorbância, t_1 o tempo para degradação da proteína [min] e C_{lin} e C_{ang} os coeficientes linear e angular da curva de calibração do reagente de Bradford [12]. A atividade específica, A_{Esp} [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$] ou [$\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$], foi expressa como unidades de enzima por quantidade de proteína total, $C_{proteína}$ [$\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$], utilizando a equação a seguir:

$$A_{Esp} = \frac{A_{ENZ}}{C_{proteína}} \quad (2)$$

Para a caracterização da enzima bromelina do fruto do abacaxi, inicialmente foi determinada a atividade proteolítica em diferentes tempos de incubação (5, 10, 20 e 30 min) de onde foram retiradas alíquotas de 0,005; 0,01 e 0,02mL do volume reacional. A determinação da atividade da enzima em função da temperatura foi realizada a partir da incubação da mistura reacional em banho-maria, por 20 minutos com variação de temperatura de 20°C a 70°C, com intervalos de 10°C. Foi medida a atividade no tempo zero e após 20 minutos, em cada temperatura. Para estudar o efeito de pH da bromelina foram utilizadas soluções tampão de 50mM de acetato de sódio (pH 4,0; 5,0); fosfato de sódio (pH 6,0 e 7,0) e Tris-HCl (pH 8,0 e 9,0) [11]. O pH foi ajustado com NaOH 2N ou HCl 2N. A determinação da atividade enzimática e a quantidade de proteína total foram realizadas através do método de digestão da caseína [13] como descrito acima.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade da bromelina foi determinada pelo método de digestão da caseína no qual o método de Bradford é usado para quantificar as proteínas. A utilização deste método possibilitou agilidade e praticidade nas análises de quantificação das proteínas, como também, nos ensaios bioquímicos de caracterização da enzima. O limite de detecção da concentração protéica desse método é de 0 a 20 μg de proteína. Ele se fundamenta na ligação da proteína ao corante Coomassie brilhante blue G-250, ligação essa que causa a mudança na absorbância máxima do corante de 495nm para 595nm. Este ensaio é bastante reproduzível, apresentando boa estabilidade de cor por cerca de 1 hora [12].

Para análise dos resultados da atividade da bromelina em diferentes condições de cultivo hidropônico *in natura* foi utilizado o método ANOVA do SISVAR, usando o teste de Tukey ao nível de probabilidade de 5%, para avaliar estatisticamente os dados obtidos. O tratamento com fertilizante foliar apresentou maior atividade da enzima bromelina quando comparado aos tratamentos $\frac{1}{2}$ MS e $\frac{1}{2}$ Hoagland, porém não diferenciou estatisticamente dos tratamentos com água e Hoagland. Os tratamentos $\frac{1}{2}$ MS e $\frac{1}{2}$ Hoagland não apresentaram diferença estatística entre si (Figura 1).

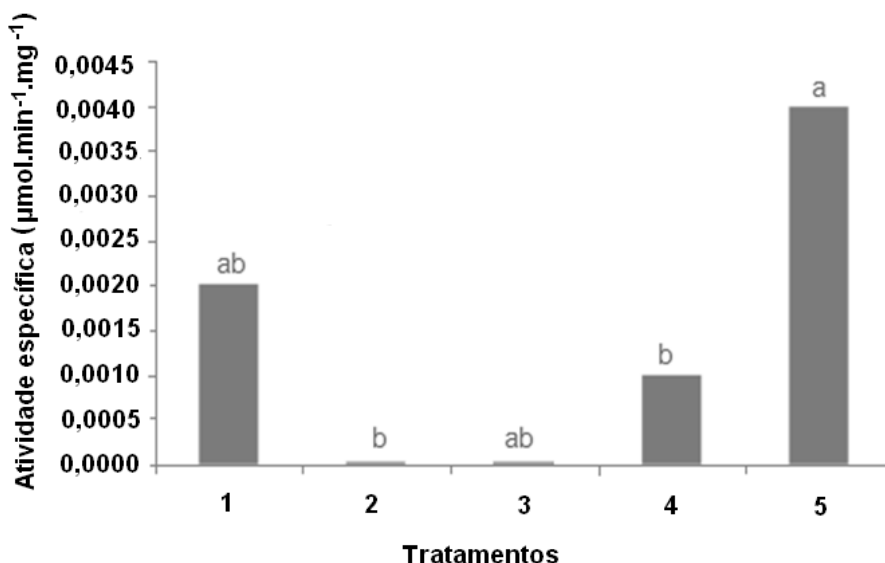


Figura 1 – Determinação da atividade específica da bromelina cultivada *in vitro* em condições de cultivo hidropônico nos seguintes tratamentos: 1. Água; 2. ½ MS; 3. Hoagland; 4. ½ Hoagland; 5. Fertilizante foliar (NIFOL)

Devido à observação de que a atividade proteolítica da bromelina do extrato das folhas do abacaxizeiro cultivado *in natura* era bastante baixa, a atividade da bromelina obtida do fruto do abacaxi foi determinada. Inicialmente foi construída uma curva padrão para observação do curso da reação enzimática relacionada ao tempo de incubação e ao volume da reação utilizada para determinar a atividade proteolítica. Nos tempos de digestão acima de 5 minutos a atividade da enzima decresce com o passar do tempo até entrar em estabilidade com o substrato. Acima de 10 minutos todos os volumes do extrato bruto protéico apresentam-se em equilíbrio (Figura 2).

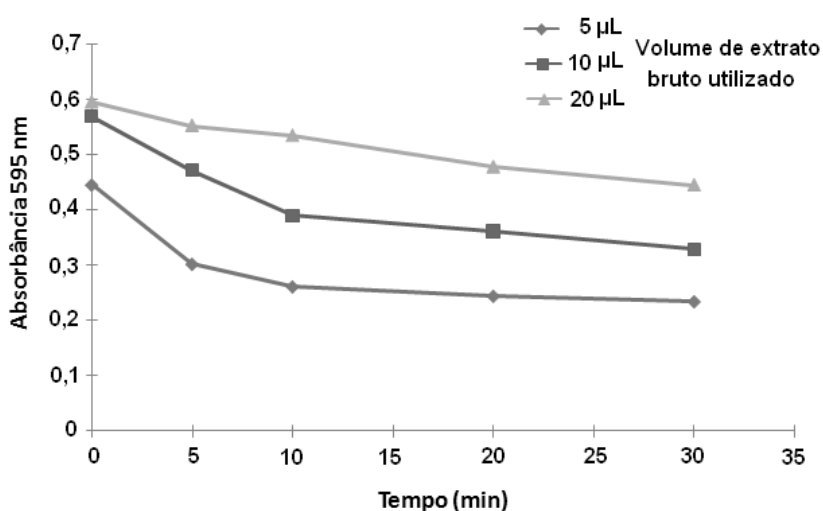


Figura 2 – Determinação da atividade proteolítica da bromelina do extrato bruto protéico do fruto do abacaxizeiro por tempo

A temperatura de armazenamento ou de exposição de uma enzima também é um fator de extrema importância para a manutenção de sua atividade catalítica, já que o calor é um agente desnaturante. Assim como o pH, a temperatura pode ser um fator de desnaturação protéica e consequentemente de perda da atividade enzimática. Baseando-se nesta possibilidade, a atividade proteolítica da enzima bromelina foi testada em diferentes temperaturas (Figura 3). Pode-se notar um decréscimo inicial da atividade enzimática entre as temperaturas de 20°C a 30°C. Em seguida, houve uma alta taxa de atividade enzimática, seguida de um decréscimo praticamente constante com a elevação da temperatura até 70°C. A bromelina apresentou

temperatura ótima de 40°C, sendo que em 70°C a enzima apresentou-se desnaturada. Estudos anteriores a esse relataram a temperatura ótima para a bromelina de 60°C sendo que além desta, a enzima apresenta-se desnaturada [7, 15]. Neste trabalho notou-se que a enzima passou a se desnaturar após a temperatura ótima encontrada. Na temperatura de 20°C pode ter acontecido um aumento na atividade enzimática devido a outros complexos enzimáticos também encontrados no extrato bruto protéico desta cultivar.

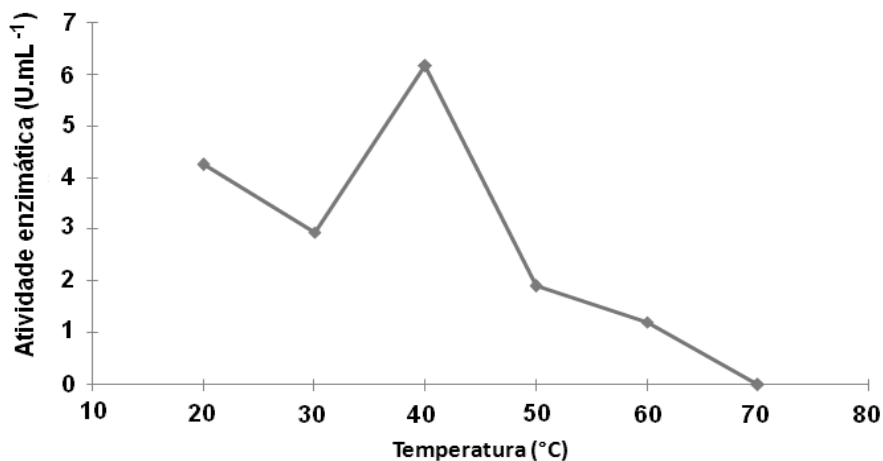


Figura 3 – Determinação da temperatura ótima da atividade enzimática da bromelina do extrato bruto protéico do fruto do abacaxizeiro

A bromelina do suco do abacaxi (extrato bruto protéico) apresentou pH ótimo de ação na faixa 5,0, no tampão acetato de sódio (Figura 4). Esse resultado difere de uma caracterização da bromelina em que o pH ótimo encontrado foi 7,5 para o *A. comosus* [16]. Porém notou-se que nesta faixa de pH não houve uma elevação da atividade enzimática. O aumento da atividade em pH 7,0 apresentado no experimento com a cv. Pérola pode ser explicado pelo fato de que um complexo de enzimas com atividade proteolítica podem ser encontradas no extrato bruto não purificado [16]. A bromelina do fruto do abacaxi contém várias proteases que diferem entre si na sua ação em diversos substratos, bem como na suscetibilidade em oxidar-se e reduzir-se, e especialmente no pH que elas hidrolisam mais rapidamente seus substratos. O pH ótimo de atividade é influenciado pela natureza do substrato, pela concentração e tipo de solução tampão utilizada e também pela presença de agentes redutores. Para auxiliar na classificação dessas enzimas, as proteases são designadas pelo pH ótimo de atividade. Portanto, para determinadas proteases também presentes no extrato bruto podemos encontrar atividade em determinadas faixas de pH como demonstrado neste estudo.

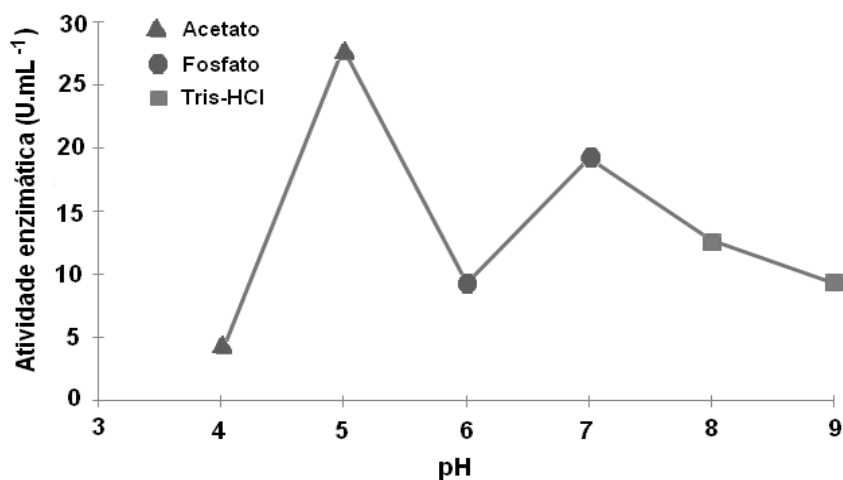


Figura 4 – Determinação do pH ótimo da bromelina do extrato bruto protéico do fruto do abacaxizeiro utilizando soluções tampão de 50mM de acetato de sódio (pH 4,0 e 5,0); fosfato de sódio (pH 6,0 e 7,0) e Tris-HCl (pH 8,0 e 9,0)

4. CONCLUSÃO

A bromelina presente no extrato bruto protéico do fruto do abacaxi cv. Pérola apresentou pH ótimo de 5,0. Também foram observados outros picos de pH, talvez resultantes de outras enzimas proteolíticas encontradas no extrato bruto. A temperatura ótima de ação da bromelina presente no extrato bruto protéico do fruto do abacaxizeiro foi de 40 °C, chegando a desnaturar-se em temperaturas acima desta. A bromelina extraída do fruto do abacaxi apresentou maior atividade proteolítica do que a extraída das folhas do abacaxizeiro cultivado *in natura* sob condição hidropônica.

1. ANUÁRIO ESTATÍSTICO DA AGRICULTURA BRASILEIRA - AGRIANUAL 2006. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio/M & S Mendes & Scotoni, (2006).
2. FERREIRA, F. R.; CABRAL, J. R. S. Melhoramento genético do abacaxizeiro. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, V.19, n.195, p.24-28, (1998).
3. CARVALHO, V. D. de; BOTREL, N. Característica da fruta de exportação. In: GORGATTI NETTO, A *et al.* Abacaxi para exportação: procedimentos de colheita e pós-colheita. Brasília: EMBRAPA/ SPI, (1996). p.7-27 (Série Publicações Técnicas FRUPEX, 23).
4. GONÇALVES, N. B. (Org.). Abacaxi. Pós-colheita. Embrapa agroindústria de Alimentos (Rio de Janeiro, RJ). Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, (2000). 45p. (Frutas do Brasil; 5).
5. DRAETTA, I.S.; GIACOMELLI, E.J. Ocorrência da bromelina e cultivares de abacaxizeiro. Colet. ITAL, v.23, n.1, p.44-55, Campinas, (1993).
6. 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: ESAL, (1995) 47p. (Dissertação de mestrado em Ciência dos Alimentos).
7. ROWAN, A. D.; BUTTLE D. J.; BARRET, A. J. The cysteine proteinases of the pineapple plant. *Biochemical Journal*, 266: 869-75 (1990).
8. GRANADA, G.G.; ZAMBIAZI, R.C.; MENDONÇA, C.R.B. Abacaxi: produção, mercado e subprodutos. B. CEPPA, Curitiba, v.22, n.2, p. 405-422, jul./dez. (2004).
9. PAULA, M.B.; MESQUITA, H.A.; NOGUEIRA, F.D. Nutrição e adubação do abacaxizeiro. Abacaxi: Tecnologia de Produção e Comercialização. EPAMIG, Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.19, n. 195, p. 33-39, (1998).
10. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, V.15, P.473-497, (1962).
11. HOAGLAND, D.R.; D.I. ARNON. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular* 347:1-32 (1950).
12. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254 (1976)
13. KUNITZ, M. Crystalline trypsin inhibitor. II. General properties. *Journal of general Physiology*, v.30, p. 295-310 (1947).
14. HALE, P.L.; GREER, P.K.; TRINH, C.T.; JAMES, C.L. Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations. *International Immunopharmacology*, 5: 783-793 (2005)
15. SUH, H.J.; LEE, H.; CHO, H.Y.; YANG, H.C. Purification and characterization of bromelain isolated from pineapple. *Han'guk Nonghwa Hakhoechi*.35: 300-307 (1992)
16. HARRACH, T.; ECKERT, K.; MAURER, H.R. Isolation and Characterization of Two Forms of an Acidic Bromelain Stem Proteinase. *Journal of Protein Chemistry*, 17: 350-361 (1998).