



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA**

**PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DA
ENZIMA BROMELINA DO ABACAXI CULTIVAR PÉROLA**

NADJMA SOUZA LEITE

**SÃO CRISTOVÃO
2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

NADJMA SOUZA LEITE

i

**PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA
BROMELINA DO ABACAXI CULTIVAR PÉROLA**

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia em recursos naturais na área de concentração Biotecnologia em Recursos Naturais.

Orientadora
Profa. Roberta Pereira M. Fernandes

SÃO CRISTOVÃO
SERGIPE - BRASIL
2010

NADJMA SOUZA LEITE

**PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA
BROMELINA DO ABACAXI CULTIVAR PÉROLA**

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia em recursos naturais na área de concentração Biotecnologia em Recursos Naturais.

APROVADA em 04 de Março de 2010

Prof. Dr. Paulo de Tarso Gonçalves Leopoldo – UFS

Profa. Dra. Beatriz Tupinambá Freitas – UFS

Profa. Dra. Roberta Pereira M. Fernandes
(Orientadora)

SÃO CRISTOVÃO
SERGIPE - BRASIL

“Sem utopia não há história. Utopia não como o irrealizável, mas como ainda não realizado. Construída, a cada dia, por homens e mulheres ao mesmo tempo idealistas e com o pé no chão.”

Robinson Cavalcanti.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, pela segurança espiritual e por permitir concluir mais uma etapa em minha carreira profissional.

À minha mãe Maria por estar sempre presentes e de grande importância em minha vida.

À minha maravilhosa família, avô (*in memoriam*), avó, tios, tias, primos e primas, pela credibilidade e incentivo ao longo de toda esta caminhada.

Ao Prof^a. Dr. Roberta Pereira M. Fernandes, pela orientação, pela contribuição com seu conhecimento e por acreditar no meu trabalho.

Ao BIOTEC/UFS por me conceder a oportunidade de realizar o mestrado em Biotecnologia em Recursos Naturais.

Aos professores do Núcleo de Biotecnologia-UFS pelos conhecimentos transmitidos.

Aos professores Dr. Paulo de Tarso e Dr^a Beatriz Tupinambá pela expressiva colaboração nas sugestões da dissertação.

À Departamento de Fisiologia pela disponibilização do Laboratório de Enzimologia para a realização de parte experimental deste trabalho.

A Capes pelo apoio financeiro no decorrer deste trabalho.

Aos Professores Dr. Socrátes Cavalcanti e Dr. Josemar Senna pelo empréstimo dos equipamentos para a realização das análises.

Aos amigos Adiles, Aline, Flávio, Gustavo, Micaele e Vitor pelos momentos de descontração, diálogos enriquecedores, por toda amizade, solidariedade e companheirismos dispensados durante o mestrado.

Aos amigos Aloísio, Cláudia, Luciano Caetano, Rômulo e Neuma pelo apoio concedido nessa jornada.

Aos amigos do Laboratório de Enzimologia pela contribuição nos trabalhos de laboratório e por tornarem o ambiente agradável para o trabalho.

A todos que me ajudaram diretamente ou indiretamente para a realização deste trabalho, serei para sempre muito grata.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	IX
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 O ABACAXIZEIRO	2
2.2 PROPAGAÇÃO DO ABACAXIZEIRO	2
2.3 A BROMELINA	3
2.4 SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	7
3 OBJETIVOS	10
3.1 OBJETIVO GERAL	10
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
4 MÉTODOS	11
4.1.1 Preparo do extrato protéico bruto	11
4.2 DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS	11
4.2.1 Determinação do conteúdo protéico pelo método modificado	11
4.2.2 Determinação do conteúdo proteico	11
4.3 MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	12
4.3.1 Determinação da atividade enzimática segundo Kunitz (1947)	12

4.3.2	Determinação da atividade enzimática segundo Kunitz (1947) e Walter (1984)	12
4.4	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	13
4.5	PURIFICAÇÃO DA BROMELINA PARA CARACTERIZAÇÃO DO PH E TEMPERATURA ÓTIMA – PROTOCOLO 1	13
4.6	PURIFICAÇÃO DA BROMELINA PARA CARACTERIZAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS	13
4.6.1	Precipitação fracionada com sulfato de amônio	13
4.6.2	Cromatografia de troca iônica	14
4.7	CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE SEPHADEX G-100	14
4.8	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA SOB CONDIÇÕES DESNATURANTES (SDS-PAGE)	15
4.9	CARACTERIZAÇÃO DA BROMELINA	15
4.9.1	Temperatura ótima de atividade	16
4.9.2	pH ótimo de atividade	16
4.9.3	Determinação dos parâmetros cinéticos K_{mapp} e V_{maxapp}	17
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
6	CONCLUSÃO	31
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
	ANEXOS	37
6.1	PROCEDIMENTO ESQUEMÁTICO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	37
6.2	PREPARO DOS PADRÕES DE TIROSINA	38

LISTA DE ABREVIATURAS

$Abs_{inicial}$	leitura inicial de absorbância
Abs_{final}	leitura final de absorbância
A_{ENZ}	atividade enzimática [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$] ou [U.mL ⁻¹]
A_{Esp}	atividade específica [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$] ou [U.mg ⁻¹]
C_{ang}	coeficiente angular da curva de calibração para o bradford
C_{lin}	coeficiente linear da curva de calibração para o bradford
$C_{proteína}$	concentração de proteína total [mg.mL ⁻¹]
$C_{tirosina}$	concentração de tirosina
d	fator de diluição (volume total/volume da alíquota)
MM_{PD}	massa molar da proteína degradada [g.mol ⁻¹]
t_1	tempo para degradação da proteína [min]
V	volume de enzima [mL]
V_{reator}	volume do reator [mL]

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema do mecanismo de ação catalítico das cisteíno-endopeptidases (Price & stevans, 1993; Wong, 1995; Belitz <i>et al.</i> , 2004).	4
Figura 2 – Fluxograma da obtenção do extrato bruto da enzima bromelina a partir do fruto de abacaxi cultivar Pérola.	11
Figura 3 – Fluxograma da purificação e caracterização da enzima bromelina.	16
Figura 4 – Perfil cromatográfico da atividade específica e absorbância da bromelina em coluna de gel-filtração Sephadex G-100.	19
Figura 5 – Influência do pH na atividade proteolítica no extrato bruto protéico.	20
Figura 6 – Influência do pH na atividade proteolítica da bromelina determinado na fração 3 obtida após cromatografia de gel-filtração em coluna Sephadex G-100.	21
Figura 7 – Influência da temperatura na atividade proteolítica da bromelinado no extrato bruto protéico.	22
Figura 8 – Influência da temperatura na atividade da bromelina determinado na fração 3 obtida após cromatografia de gel-filtração em coluna Sephadex G-100.	23
Figura 9 – Eletroforese em gel de poliacrilamida. I-Suco, II- precipitado, III- Sobrenadante, IV-Fração 1, V-Fração 2, VI-Fração 3, VII-Fração 4, VIII-Fração 5 e IX-Fração 6.	24
Figura 10 – Eletroforese em gel de poliacrilamida. I-Fração 7, II- Fração 8, III- Fração 9, IV- Fração 10, V-Fração 11, VI-Fração 12, VII-Fração 13, VIII-Fração 14 e IX-Fração 15.	24
Figura 11 – Eletroforese em gel de poliacrilamida. I- Marcador molecular, II- Marcador molecular, III- Sobrenadante de 60% (30 µg), IV- Sobrenadante de 60% (30 µg), V- Sobrenadante de 60% (50 µg), VI- Precipitado de 60% (30 µg), VII- Precipitado de 60% (30 µg), VIII- Precipitado de 60% (50 µg), IX- Sobrenadante de 80% (30 µg), X- Sobrenadante de 80% (50 µg), XI- Precipitado de 80% (30 µg) e XII- Precipitado de 80% (50 µg).	25
Figura 12 – Perfil cromatográfico da atividade específica e absorbância da bromelina em cromatografia de troca iônica CM Sephadex C-50.	27
Figura 13 – Perfil cromatográfico da atividade enzimática da bromelina em cromatografia de gel-filtração Sephadex G-100.	29
Figura 14 – Efeito da concentração de substrato na atividade proteolítica da bromelina cultivar Pérola, determinada nas frações obtidas (6-10) após cromatografia de gel filtração em coluna Sephadex G-100.	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção de abacaxi, em 2007.	3
Tabela 2 – Ação da bromelina do extrato do talo em vários substratos.	6
Tabela 3 – Purificação da bromelina do fruto do abacaxizeiro (protocolo 1).	18
Tabela 4 – Precipitação fracionada da bromelina com sulfato de amônio (protocolo 2).	25
Tabela 5 – Purificação da bromelina do fruto do abacaxizeiro (protocolo 2).	26
Tabela 6 – Precipitação fracionada da bromelina com sulfato de amônio.	28
Tabela 7 – Purificação da bromelina do fruto do abacaxizeiro (protocolo 3).	28

RESUMO

LEITE, Nadjma Souza. **Purificação parcial e caracterização da enzima bromelina do abacaxi cultivar pérola**. Sergipe: UFS, 2009. 62p.

O abacaxi (*Ananas comosus*) é uma das principais fontes da enzima proteolítica bromelina, uma protease encontrada no caule, folhas, raízes e no fruto dessa planta e em todas as outras da família Bromeliaceae. A produção da bromelina ainda é pequena, comparada às necessidades do mercado, tornando-se um produto de alto valor comercial que não é produzido no Brasil. A Bromelina tem amplo uso na indústria alimentícia, têxtil, cervejeira e farmacêutica, assim como na medicina. Com isso, vários métodos de purificação da bromelina estão em estudo, sobretudo da bromelina do fruto. A separação e purificação de biomoléculas, tais como proteínas, é extremamente importante para o estudo e caracterização. O presente trabalho tem como objetivo a purificação e caracterização da bromelina da polpa do abacaxi cultivar Pérola. Três protocolos de purificação da enzima bromelina foram testados. A purificação envolveu a precipitação com sulfato de amônio, seguida de cromatografia de gel-filtração em Sephadex G-100 ou cromatografia de troca iônica em CM-Sephadex C-50. As frações parcialmente purificadas foram caracterizadas quanto ao pH e temperatura ótimos, e parâmetros cinéticos K_{mapp} e V_{maxapp} para o substrato caseína. O pH ótimo encontrado para a bromelina do extrato protéico e a parcialmente purificada foi pH 5,0, assim não houve diferença na ação de pH ótimo entre o extrato protéico e a fração 3 obtida da purificação com Sephadex G-100. A temperatura ótima obtida no extrato protéico bruto de 40°C enquanto que na fração foi de 60°C. O K_{mapp} encontrado foi 0,6910% e V_{maxapp} 1,913 mmols.min⁻¹.mg⁻¹. A eletroforese SDS-PAGE mostrou que a bromelina da polpa do *Ananas comosus* teve peso molecular de aproximadamente 30 kDa.

Palavras-chave: *Ananas comosus*, protease vegetal, atividade proteolítica, parâmetros bioquímicos

Orientação: Roberta Pereira M. Fernandes – UFS

ABSTRACT

LEITE, Nadjma Souza. **Partial purification and characterization of pineapple enzyme bromelain**. Sergipe: UFS, 2009. 62p. (Dissertation – Master in Biotechnology)

Pineapple tree (*Ananas comosus*) is the main source of bromelain, a proteolytic enzyme found in wood, leaves, roots and fruit of this plant and all other species of the Bromeliaceae family. Bromelain production is still smaller than the amount required which results in the high price of this enzyme. In Brazil there is no commercial bromelain production. Bromelain is used in food, drink and pharmaceutical industry, as well as in medicine. Because of its wide use of bromelain several studies aim to purify this enzyme. These studies use mainly pineapple fruit. Biomolecules separation, such as protein purification, is the importance to study and characterize these molecules. The purpose of this study was purification and characterization of bromelain present in the pineapple fruit Pérola cultivar. Three purification protocols were tested in this work. Purification involved protein precipitation with ammonium sulfate, gel filtration chromatography in Sephadex G-100 column or ion-exchange chromatography in CM Sephadex C-50. Bromelain from the crude extract and partially purified was characterized regarding to optimal pH e temperature and the kinetic parameters K_{mapp} e V_{maxapp} for casein substrate. The enzyme from the crude extract and partially purified had the same optimum pH, which was 5,0. Optimum temperature was 40°C and 60°C for the enzyme in the crude extract and partially purified, respectively. The K_{mapp} found was 0,6910% and V_{maxapp} 1,913 mmols.min⁻¹.mg⁻¹. Electrophoresis in a polyacrylamide gel under denaturing conditions, SDS-PAGE, showed that bromelain from *Ananas comosus* fruit Pérola cultivar has molecular weight of about 30 kDa.

Key words: *Ananas comosus*, vegetal protease, proteolytic activity, biochemical parameters

Advisor: Roberta Pereira M. Fernandes – UFS

1 INTRODUÇÃO

O abacaxi (*Ananas comosus* L. MERRIL) é uma fruta bastante apreciada nos países tropicais e subtropicais por apresentar excelente qualidade sensorial decorrente do sabor e aroma característicos que lhe são atribuídos por diversos constituintes químicos tais como os açúcares, os ácidos, os ésteres, os carotenóides e demais constituintes vitamínicos, aminoácidos e protéicos (BOTREL & ABREU, 1994).

O Brasil é um dos grandes produtores mundiais de abacaxi, sobretudo das cultivares Pérola e Smooth Cayenne. O fruto é a parte comercializável da planta. A fruta em calda e suco pasteurizado são os principais produtos e o restante, formado por caule, folhas, casca, coroa e talos, que representam cerca de 70% da planta, é considerado resíduo agrícola e não tem sido devidamente aproveitado, resultando em desperdício econômico.

A bromelina é uma protease de origem vegetal obtida de diversas espécies da família Bromeliaceae. O abacaxizeiro, *Ananas comosus*, é a principal fonte dessa enzima, um produto de alto valor comercial, que não é fabricado no Brasil. Esta protease encontra-se presente no fruto, folhas, caule e raízes da planta. Os diversos tipos de utilização são todos baseados em sua atividade proteolítica, como nas indústrias alimentícias para o amaciamento de carnes vermelhas, na produção de pães e biscoitos a partir de farinha de trigo de alto teor protéico, na preparação de leite de soja e na clarificação de cerveja (FREIMAN e SABAASRUR, 1999 e CÉSAR, 2000). O extrato da bromelina bruta do abacaxi (*Ananas comosus*) é uma mistura complexa rara de diferentes proteinases e de outros inibidores peptídeos, em adição a outros componentes não caracterizados. As cisteíno proteinases têm recentemente atraído interesses renovados ao se mostrarem envolvidas na progressão de várias doenças humanas. Uma importante aplicação farmacêutica de cisteíno proteinases é o desbridamento enzimático de tecidos necróticos de úlceras e feridas de queimaduras. Desta maneira, a bromelina também tem aplicação na indústria farmacêutica. Sua ação tem sido relatada em vários processos biológicos, tais como: inibição da agregação plaquetária, atividade fibrinolítica, ação anti-inflamatória, ação antitumoral, modulação de citocinas e imunidade, propriedade debridante de pele, aumento da absorção de outras drogas, propriedades mucolíticas, facilitador de digestão, acelerador da cicatrização, melhora da circulação e sistema cardiovascular (HALE *et al.*, 2005).

A bromelina comercial é obtida do caule do abacaxi. No entanto, o fruto também é uma alternativa de matéria-prima devido ao fato de que a enzima presente neste apresenta uma atividade proteolítica maior que a do caule (PARK, 2001). A bromelina do caule é uma enzima sulfidrílica enquanto que a do fruto é uma proteína ácida. As enzimas proteolíticas encontradas nos caules recebem o nome de bromelina do caule e tem número sistemático EC 3.4.22.32, e as encontradas no fruto são chamadas de bromelina do fruto ou simplesmente, bromelina, com o número sistemático EC 3.4.22.33 (CÉSAR, 2000). Esta possui especificidade ampla para ligações peptídicas.

Com o crescente desenvolvimento da biotecnologia, tornou-se necessário o conhecimento de novas técnicas de separação e purificação de biomoléculas, tais como enzimas e proteínas de origem animal, vegetal e microbiana. Estas técnicas devem manter as propriedades químicas e físicas das biomoléculas e, além disso, devem ser altamente eficazes na purificação. A enzima purificada pode então ser caracterizada quanto aos parâmetros bioquímicos tais como pH e temperatura ótimos de ação, parâmetros cinéticos e determinação do peso molecular. O conhecimento sobre pH e temperatura ótimos de ação das enzimas é de grande importância, visto que a maioria é sensível a alteração do pH e temperatura do meio. Devido ao amplo uso e importância da bromelina há crescente necessidade de estudar processos viáveis de extração, purificação e caracterização dessas enzimas. Assim, esse trabalho teve como objetivo a purificação e caracterização bioquímica da enzima bromelina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O abacaxizeiro

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 (AGRIANUAL, 2008). Além do *Ananas comosus* todas as outras espécies de *Ananas* são encontradas no Brasil, sendo este país um dos principais centros de diversidade genética (CABRAL, 2000). As excelentes características qualitativas do fruto abacaxizeiro refletem na sua importância sócio-econômica (CARVALHO & BOTREL, 1996).

O Brasil constitui um dos principais centros de diversidade de abacaxi, cujos recursos genéticos têm sido utilizados para intercâmbio de germoplasma. Como o sucesso dos programas de melhoramento genético depende de ampla variabilidade é imprescindível a coleta, preservação e avaliação de germoplasma de abacaxi. A Embrapa conta com Banco Ativo de Germoplasma de abacaxi que reúne ampla variabilidade genética, constituído de 678 acessos pertencentes a espécies de interesse imediato e/ou potencial para o melhoramento genético do abacaxizeiro (TODAFRUTA, 2005).

No Brasil o cultivo do abacaxizeiro visa principalmente o mercado de frutas frescas, o que justifica o fato de mesmo sendo grande produtor mundial, ter participação modesta no mercado internacional (AGRIANUAL, 2008). Seu fruto é consumido ao natural ou na forma de sorvetes e doces. Quando industrializado, o fruto pode apresentar-se como polpa, xarope, caldas ou suco pausterizado. O caule é matéria-prima para a indústria de alimentos e para obtenção de álcool etílico e gomas. As demais partes do abacaxizeiro podem ser usadas na alimentação animal, como material fresco ou ensilado.

O Nordeste do Brasil destaca-se como a principal região produtora de abacaxi, além de apresentar a maior área colhida, com uma produção de 1.353.497 toneladas de frutos em 26.111 hectares (AGRIANUAL, 2008). A cultura predomina na costa brasileira, com o foco dos produtores direcionado às variedades destinadas ao mercado interno. A safra se concentra, principalmente, entre os meses de outubro a janeiro, tendo os estados do Pará (895.089 t), Paraíba (630.585 t) e Minas Gerais (597.803 t) como os principais produtores nacionais (AGRIANUAL, 2008).

As principais variedades plantadas nas regiões produtoras de abacaxi do mundo são: Smooth Cayenne, Pérola, Perolera, Red Spanish, Natal Queen, Manzana, Kew e Cabezona. A variedade Smooth Cayenne representa 75% da produção mundial. Entre as variedades de abacaxi mais cultivadas no Brasil destacam-se a Smooth Cayenne e a Pérola que lideram o mercado brasileiro (CABRAL & FERREIRA, 2001). Estes autores, como citado anteriormente, referem-se à vulnerabilidade da cultura do abacaxi que tem como base quase que exclusivamente um ou dois genótipos.

A cultivar Pérola, também conhecida como Pernambuco ou Branco de Pernambuco, produz muitas mudas do tipo filhote, tem porte ereto e folhas espinhosas. Apresenta frutos com forma cônica, a casca pouco colorida, a haste frutífera, folhas longas com finos espinhos, polpa de coloração amarelo-clara, doce e menos ácida que o Smooth Cayenne e possui coroa grande (CARVALHO & BOTREL, 1996).

2.2 Propagação do abacaxizeiro

O Abacaxizeiro apresenta sistema de reprodução sexuada e sistema de propagação vegetativa dominante e muito eficiente. É de fundamental importância para obtenção de produção conhecer o método de propagação da cultura. Na cultura do abacaxi, a qualidade da muda tem influência tão forte no estado fitossanitário,

desenvolvimento, produção e rendimento das plantações, que a obtenção e utilização de material de plantio, com vigor e sanidade superiores, podem ser consideradas fatores decisivos para se alcançar sucesso econômico no cultivo da fruteira (REINHARDT & CUNHA, 1999).

A muda do abacaxizeiro é o principal elemento disseminador do patógeno causador da fusariose, doença causada pelo fungo *Fusarium subglutinans*, que ataca a planta tanto na fase vegetativa quanto produtiva, estando presente no Brasil em todas as regiões produtoras. Além disso, o Brasil ocupa a terceira colocação no *ranking* mundial na produção de abacaxi (Tabela 1) e sendo assim, assume grande importância a utilização de um método eficiente, seguro e de baixo custo para a propagação da cultura.

Tabela 1 – Produção de abacaxi, em 2007.

Quantidade produzida, valor da produção, área plantada e área colhida da lavoura temporária				
Lavoura temporária = Abacaxi				
Ano = 2007				
Brasil e Unidade da Federação	Variável			
	Área plantada (Hectares-SIDRA)	Área colhida (Hectares-SIDRA)	Quantidade produzida (Mil frutos)	Valor da produção (Mil Reais)
Brasil	72.055	71.886	1.784.278	951.296

Fonte: IBGE – Produção Agrícola Municipal (2007)

2.3 A bromelina

A Bromelina é uma protease vegetal encontrada no caule, folhas, raízes e no fruto do abacaxi (*Ananas comosus*) e em todas as espécies do gênero *Bromeliaceae*. No entanto, sua produção ainda é pequena, comparada às necessidades do mercado, tornando-se um produto de alto valor comercial, por não ser produzido no Brasil.

A atividade proteolítica é o principal parâmetro de avaliação da qualidade e do valor comercial da bromelina. O preço no catálogo da Sigma (2009) de um preparado parcialmente purificado é de cerca de US\$3179/kg e o preço da enzima usada industrialmente é em média 20% menor que este (MEINIG, 1999). O valor comercial aumenta à medida que aumenta sua pureza e, conseqüentemente, a sua atividade. A bromelina comercial é formada por uma mistura de quatro proteases: bromelina do fruto, bromelina do talo, ananaína e comosaína.

Nos primeiros estágios de desenvolvimento do fruto do abacaxizeiro, os tecidos menos maduros, especialmente aqueles ainda suculentos, contêm pouca ou nenhuma atividade de bromelina detectável, porém seu nível aumenta rapidamente, mantendo-se elevado até o amadurecimento (BORZANI *et al.*, 2001). Essa é uma das vantagens da utilização das proteases do abacaxi em comparação com proteases de outros frutos. Durante a maturação ocorre uma diminuição da atividade proteolítica, mas, mesmo assim, o abacaxi o único fruto que possui concentrações relativamente altas de protease no estado maduro. No mamão e no figo, as proteases papaína e ficina, respectivamente, somente são encontradas em altos níveis quando o fruto está verde, com o amadurecimento a concentração das proteases praticamente desaparecem (LOPES *et al.*, 2009 e RABELO *et al.*, 2004).

As enzimas são moléculas orgânicas presentes nas células de organismos vivos, com a função específica de catalisar reações químicas (SAID & PIETRO, 2002). Nessa classe de moléculas estão as proteases vegetais, entre elas: a papaína, bromelina, ficina, fastousaina e a quimopapaína. Essas proteases, assim como algumas proteases microbianas, contém o grupo $-SH$, no sítio ativo. A bromelina do caule do abacaxizeiro, por exemplo, possui o grupo sulfidríla, no sítio ativo, que é essencial para a sua atividade proteolítica (REGULY, 2000). Esse resíduo sulfidrílo define a classe dessas enzimas como cisteíno proteinase (Figura 1).

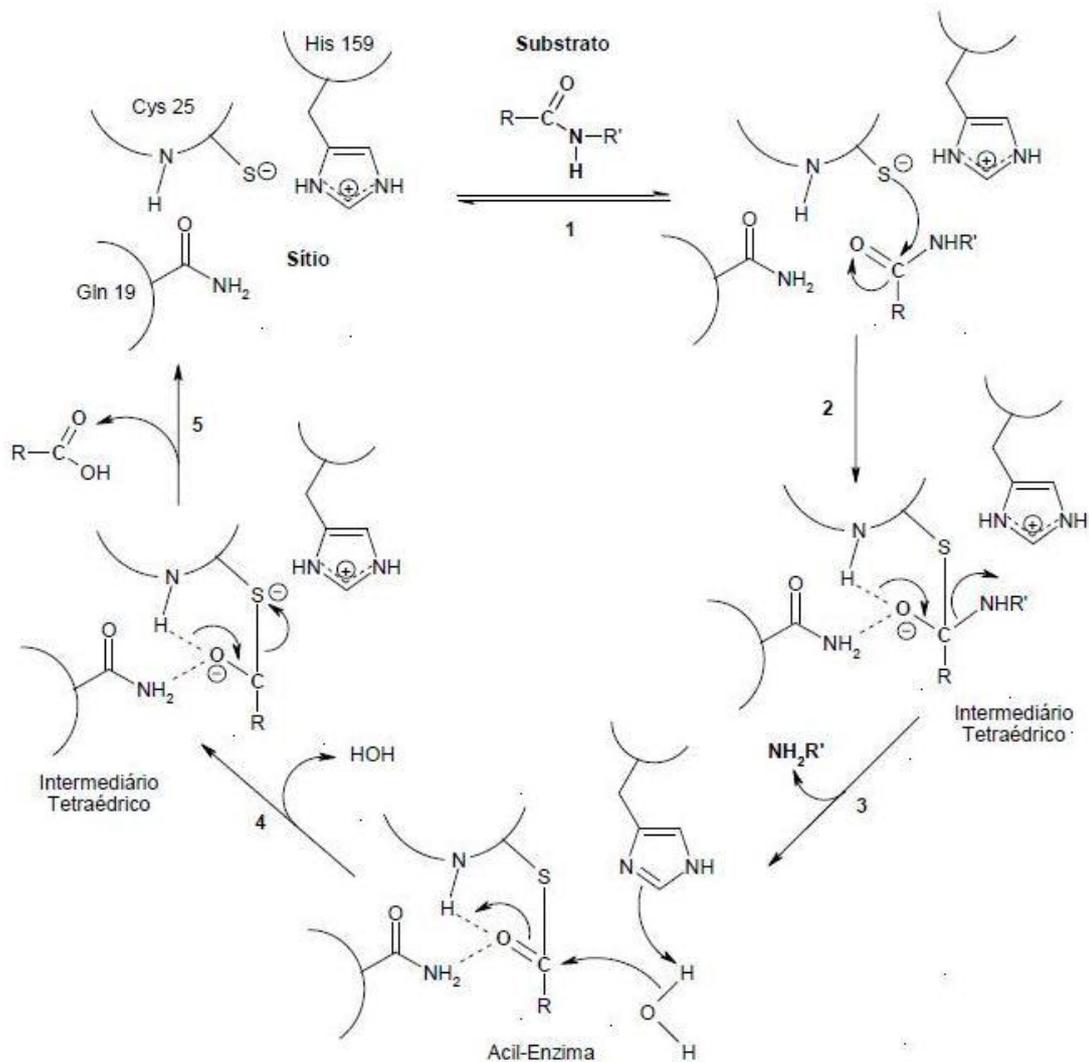


Figura 1 – Esquema do mecanismo de ação catalítico das cisteíno-endopeptidases (Price & stevans, 1993; Wong, 1995; Belitz *et al.*, 2004).

As cisteíno proteinases são um grupo de enzimas que pertence a uma das quatro classes principais de enzimas proteolíticas, e é gerado por uma variedade de organismos, inclusive vírus (ALLAIRE *et al.*, 1994), bactérias, protozoários, fermentos, plantas, helmintos, insetos, e mamíferos (BAKER & DRENTH, 1987; POLGAR, 1989; SHAW, 1990; BERTI & STORER, 1995). As cisteíno proteinases são grupos difundidos de enzimas que catalisam a hidrólise de diferentes proteínas e executam um papel importante na degradação e processamento de proteínas intracelular (BOND & BUTLER, 1987; CHAPMAN *et al.*, 1997). Além disso, nas plantas, as cisteíno proteinases podem estar presentes em todos os órgãos e são envolvidas em praticamente todo aspecto da fisiologia e desenvolvimento da planta.

O extrato bruto a partir do talo do abacaxi (*Ananas comosus*) é uma mistura complexa e rara de diferentes cisteíno proteinases e outros inibidores peptídeos, em adição a alguns outros componentes não ainda caracterizados. Estudos recentes tem relatado semelhanças, tais como sequência e alinhamento de resíduos de aminoácidos entre a enzima do abacaxi e a papaína (PAYROL *et al.*, 2008).

Alguns inibidores típicos de grupos sulfidrílicos, tais como metais pesados e agentes oxidantes são potentes inibidores de bromelina. A maioria de inibidores de proteases isoladas de materiais biológicos é específico para tripsina e quimiotripsina, assim como para proteases de serina (RYAN, 1973 e VOGEL, 1968). Em contraste com o grande número de estudos dedicados ao mecanismo de ação desta classe de inibidores naturais, muito pouco é conhecido sobre o mecanismo de inibição das proteases sulfidrilas através de inibidores de proteína (LASKOWSKI & SEALOCK, 1971).

Bromeliaceae é uma família de plantas caracterizada como possuindo quantidades altas de enzimas proteolíticas incluídas na subfamília de C1A das cisteíno peptidases (BARRET *et al.*, 2004). Estudos prévios feitos em espécies que pertencem a esta família mostraram que *Ananas comosus* (MURACHI & YAMAZAKI, 1970 e ROWAN & BUTTLE, 1994), *Bromelia antiacantha* (VALLÉS *et al.*, 2007), *B. balansae* (PARDO *et al.*, 2001), *B. fastuosa* (CABRAL *et al.*, 2006), *B. hieronymi* (BRUNO *et al.*, 2006), *B. pinguin* (ABREU *et al.*, 2007) e *Pseudananas macrodentes* (LÓPES *et al.*, 2001) possuem mais de uma protease e, na maioria dos casos, estão presentes isorformas. Do *Ananas comosus* foram purificadas e caracterizadas quatro cisteíno peptidases: bromelina do caule (ROWAN & BUTTLE, 1994; HARRACH *et al.*, 1995; NAPPER *et al.*, 1994 e ROWAN *et al.*, 1988), bromelina da fruta (ROWAN *et al.*, 1990 e ROWAN & BUTTLE, 1994), comosaína (NAPPER *et al.*, 1994; ROWAN *et al.*, 1990 e SILVERSTEIN, 1974) e ananaína (ROWAN & BUTTLE, 1994; HARRACH *et al.*, 1995; NAPPER *et al.*, 1994; ROWAN *et al.*, 1988; SILVERSTEIN, 1974; CARTER *et al.*, 2000 e LEE *et al.*, 1997).

Murachi *et al.* (1960) demonstrou que a bromelina, quando comparada a papaína (Tabela 2), apresenta atividades similares para a caseína, mas que a bromelina frente a hemoglobina é quatro vezes mais ativa que a papaína. Considerando que para substratos sintéticos de tripsina, a bromelina só tem 1/15 ou 1/20 da atividade da papaína, sugerindo que a especificidade das duas enzimas não é a mesma.

Tabela 2 – Ação da bromelina do extrato do talo em vários substratos.

Substrato	pH	Atividade específica	Relação de Atividade: bromelina para papaína
Caseína	7,2	7,98	1,1
Hemoglobina	7,2	6,32	4,1
BAEE	7,2	1,10	0,065
BAA	7,2	0,6	0,043
L-leucinamida	8,1	0,31	
HPLA ^(*)	7,5	0,2	
ATEE	7,2	0	
CBZ-L-Glu-L-Tyr	4,0 e 7,6	0	
CBZ-L-Gly e anilina ^(**)	5,0	0,28 x 10 ⁻³	0,35

Fonte: The Journal of Biological Chemistry ^(*) Hippuryl-*dl*- β -phenyllactate; ^(**) A síntese de CBZ-L-glycinanilide foi determinado.

Segundo Rowan et al. (1988), existem dois tipos distintos de bromelina do abacaxi, a do talo subterrâneo e a da fruta, que diferem basicamente na seqüência de aminoácidos de sua composição, são imunologicamente diferentes e assim, certamente produtos de genes distintos. A bromelina produzida e utilizada industrialmente é uma mistura das duas.

Rowan et al. (1990), demonstrou que a bromelina do fruto apresentou atividade proteolítica maior que a bromelina do talo, quando ensaiadas com diversos substratos protéicos. No entanto, a bromelina do fruto apresentou máxima atividade em pH 8,0 e temperatura de 70°C, enquanto que a do talo apresentou atividade máxima a 60°C e pH 7,0. A bromelina do caule é uma enzima relativamente estável, não se deteriorando rapidamente sob armazenagem.

De acordo com Murachi (1970), a bromelina da fruta tem peso molecular de 31 kDa, possui menor concentração de lisina, arginina e histidina e o aminoácido terminal é um resíduo de alanina. Isto comprova estudos realizados por Martin et al. (1992), que mostraram que a bromelina do fruto é uma protease de massa molecular igual a 31 kDa com ponto isoelétrico 4,5, enquanto que a bromelina do caule tem massa molecular igual a 28 kDa e ponto isoelétrico 9,55.

A atividade da enzima bromelina tem sido estudada por vários pesquisadores, usando a técnica de micropropagação. A técnica de propagação *in vitro*, sistema rápido de clonagem quando comparado com o sistema de propagação convencional, pois permite obter milhares de plantas a partir de uma única gema axilar em pequeno período de tempo, é uma técnica que pode ser utilizada como alternativa para o aumento da produção do abacaxi, aumentando assim a disponibilidade para consumo e extração da enzima.

De acordo com Hernadéz et al. (1998), os extratos obtidos de folhas possuem maiores valores de atividade quando comparado com gemas e agregado de gemas de abacaxi *in vitro*. Por outro lado, Mercier & Yoshida (1998) compararam a atividade proteolítica da bromelina em folhas de bromelina *antiacantha* cultivadas *in vitro* recém formadas e com seis meses de cultivo e concluíram que a atividade foi maior em plantas cultivadas aos seis meses *in vitro*. A atividade proteolítica da enzima depende de vários fatores como variedade, parte e idade da planta da qual é extraída. Piza et al. (2002), comparou a atividade da enzima bromelina em gemas, raízes e parte aérea de plantas de

abacaxi micropropagado em meio salino, onde observaram que a atividade da enzima bromelina foi maior em gemas e raízes, variando em função dos tratamentos salinos e fase do desenvolvimento vegetal.

A Bromelina possui diversos usos, todos baseados em sua atividade proteolítica. A sua importância econômica está relacionada com a produção de fármacos para o tratamento de distúrbios digestivos, feridas e inflamações, preparo de colágenos hidrolisados, na sua utilização nas indústrias têxteis para amaciamento de fibras e a bromelina ainda é usada na indústria alimentícia para clarificação de cervejas, na fabricação de queijos, no amaciamento de carnes, no preparo de alimentos infantis e dietéticos, entre outros. Além desses a bromelina é usada na produção de detergentes. Também é usada em composições cosméticas (CHATSWORTH, 1996).

A atividade da bromelina tem sido também demonstrada em vários processos biológicos relacionados a saúde, atuando na inibição da agregação plaquetária (ROWAN *et al.*, 1990); possui atividade fibrinolítica (TAUSSIG & NIEPER, 1979); ação anti-inflamatória e imunomodulatória (HALE *et al.*, 2005; SECOR *et al.*, 2005; WEN *et al.*, 2006); ação anti-tumoral (JEUNG & FOSTER, 1980); atua sobre a modulação de citocininas e do sistema imune (WHITE *et al.*, 1988); como adjuvante na absorção de drogas (MORITA *et al.*, 1979); possui propriedade mucolíticas (LIVIO *et al.*, 1978); assistência na digestão (DE-GIULI & PIROTTA, 1978); adjuvante na cicatrização (INOUE *et al.*, 1994); e aumento na capacidade cardio-respiratória (UHLIG & SEIFERT, 1981). Além disso, foi aplicado na atividade anticâncer (HARRACH *et al.*, 1994) e na imunização de vírus de gripe (VARENIKOVÁ *et al.*, 1995).

Wen *et al.* (2006) mostrou que administração oral de bromelina aumenta a diminuição na defecação em ratos pós-operatórios abdominais. Resultados mostraram que a bromelina aumentou o peso molhado, peso seco, conteúdo de água e número de pelotas fecais nos ratos laboratorizados, além de ratos manipulados mecanicamente, sugerindo melhoria de ileumes pós-operatório.

2.4 Separação e Purificação de proteínas

O Brasil possui uma grande variedade de frutas e vegetais, sendo que a maioria é de baixo custo e facilmente encontrada em todo o território nacional. Essas frutas e vegetais são fontes inesgotáveis de enzimas que podem ser utilizadas *in natura* ou como extrato bruto, obtido por procedimentos simples de extração. Dependendo da aplicação analítica, faz-se necessária a purificação da enzima de interesse que, geralmente, é feita empregando-se procedimentos envolvendo várias etapas de pré-purificação, e uma delas consiste no emprego de coluna cromatográficas. Esta etapa do processo de purificação pode resultar em um grande número de frações, tornando assim o monitoramento da atividade enzimática das frações uma etapa lenta.

Muitas técnicas têm sido utilizadas para a recuperação e purificação de proteínas e enzimas de origem animal, vegetal ou microbiana. Técnicas tradicionais como a precipitação, extração com solventes e filtração geralmente tem alto poder de concentração mais baixa purificação. Técnicas mais modernas como cromatografia de afinidade, troca iônica ou gel-filtração, eletroforese, extração em duas fases aquosas, extração com micela reversa são mais eficientes, resultando em maior recuperação e purificação, muitas vezes até a homogeneidade.

A escolha do método depende das propriedades da proteína e do grau de pureza desejado. Com relação à cromatografia, por exemplo, existem vários princípios de separação que são selecionados de acordo com as propriedades físico-químicas de cada substância de interesse. Assim, para uma amostra que contém uma mistura de proteínas de diversas massas molares, pode-se aplicar a gel filtração que utiliza o princípio de separação por tamanhos. Quando o fator é a hidrofobicidade, a melhor opção é a cromatografia por interação hidrofóbica (ASENJO, 1990).

A grande questão ao iniciar um processo de purificação é o grau de pureza exigido para a proteína. Proteínas para fins terapêuticos ou de uso direto em humanos

necessitam de alto grau de pureza, o que nem sempre é necessário para as enzimas que serão aplicadas em processos industriais. Em purificação em larga escala, o processo normalmente consiste de 4 a 6 etapas que podem ser divididas em dois grupos. O primeiro, formado pelos processos de obtenção do extrato proteico: separação e ruptura de células, separação dos fragmentos e concentração da proteína. No segundo, o objetivo é purificar a proteína através das seguintes etapas: pré-tratamento ou isolamento primário, purificação e refinamento final (ASENJO, 1994).

Neste sentido, o avanço no desenvolvimento de pesquisas do campo da bioseparação tem sido limitado pela complexidade do processamento de produtos farmacêuticos e biológicos. De fato, 50 a 90% do custo para obtenção de um produto biológico está na estratégia de purificação, havendo necessidade de se buscar técnicas de bioseparação eficientes e econômicas para se atingir altos índices de purificação e recuperação, além de preservar atividade biológica da molécula (DIAMOND & HSU, 1992).

Os processos de recuperação e isolamento são distintos para cada enzima, embora tenham em comum a maior parte do processo e operação envolvidas. A variação de escala, ou seja, a ampliação de um processo de recuperação, acertado em escala de laboratório, para escala ou dimensão maior, de bancada ou industrial, é um dos problemas complexos que envolvem o isolamento de enzimas e, por extensão, todos os processos biotecnológicos de uma maneira bem geral (REGULY, 2000).

Estudo de purificação de endopeptidases realizados recentemente por Payrol *et al.* (2008) mostrou que a fração maior (NR) e a menor (NR1) resultante da cromatografia de troca catiônica foram misturadas e carregadas na cromatografia de troca aniônica, obtendo logo em seguida duas principais frações (A1 e A2), seguidas por outras três frações menores (A3 a A5) após a aplicação do gradiente salino. Os dois principais componentes proteolíticos foram purificados, frações A1 e A2, apresentando pl ácido e alta atividade proteolítica. A massa molecular foi determinada por MALDI-TOF com aproximadamente 23 kDa. Sendo assim, foi proposto estas duas novas endopeptidases, Pinguinain A1 e Pinguinain A2.

Rowan *et al.* (1988) usou cromatografia de troca catiônica de alta resolução e cromatografia de afinidade em Sepharose-Phe-glicinaldeído para obter uma preparação altamente purificada de ananaína, a qual foi caracterizada como uma nova cisteína proteínase distinto da bromelina do talo (EC 3.4.22.32), a maior proteínase derivada de talo do abacaxi.

Segundo Napper *et al.* (1994), a bromelina do talo e uma mistura de anaína e comosaína foram purificadas a partir do extrato bruto do talo do abacaxi por dois estágios de cromatografia de troca catiônica em S-Sepharose. Análise cromatográfica Mono S começando do material bruto revelou um perfil de eluição similar ao que foi previamente reportado por Rowan *et al.* (1988). Após purificação foi julgada uma pureza maior que 90% por SDS-PAGE, o qual revelou uma proporção de 5:1 de ananaína (aproximadamente 23,8 kDa) para comosaína (aproximadamente 24,4 kDa). O produto exibiu amidolítica para ambos Bz-Phe-Val-Arg-pNA e Z-Arg-Arg-pNA, confirmando a presença de anaína e comosaína, respectivamente.

A caracterização bioquímica da bromelina tem evidenciado diferentes características entre as enzimas produzidas por diferentes espécies.

A caracterização da bromelina por cromatografia de troca iônica usando Duolite CS101 a pH 6,05 resultou em boa resolução de dois componentes, os quais parecem corresponder a dois componentes principais encontrados por eletroforese do material bruto a pH 7,4. Os dois componentes são notavelmente semelhantes um ao outro nas suas atividades frente a várias proteínas, polipeptídeos e substratos sintéticos (MURACHI & NEURATH, 1960).

O uso de diferentes procedimentos de cromatografia de troca-iônica resultou em uma pequena proteínase não glicosilada básica chamada ananaína EC 3.4.22.31 (ROWAN *et al.*, 1988), ou bromelina F9 (HARRACH *et al.*, 1995). Muito recentemente a sequência completa de aminoácido de ananaína/F9 foi informada (LEE *et al.*, 1997). Além

disso, a fração do lado da ananaína e comosaína foi isolada e parcialmente caracterizada (ROWAN *et al.*, 1990 e NAPPER *et al.*, 1994). Ambas apareceram em separáveis e caracterizáveis formas de enzimas múltiplas. As três enzimas básicas de talo, bromelina do caule, ananaína, e comosaína, foram consideradas ser geneticamente distintas como proteinases de cisteína, as quais são responsáveis pelo metabolismo de proteínas, uma rede fundamental de reações requeridas durante o ciclo de vida.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver um protocolo de purificação total, usando métodos cromatográficos, para a enzima bromelina do fruto do abacaxizeiro.

3.2 Objetivos Específicos

- Purificar e caracterizar bioquimicamente a enzima bromelina do fruto do abacaxizeiro.
- Caracterizar a bromelina purificada quanto aos parâmetros bioquímicos: temperatura e pH ótimos.
- Caracterizar a bromelina purificada quanto aos parâmetros bioquímicos: cinéticos: K_m e V_{max} .

4 MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Enzimologia do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe, utilizando o abacaxizeiro cultivar Pérola. O abacaxi foi obtido no Mercado Municipal de Aracaju no estágio maduro.

4.1.1 Preparo do extrato protéico bruto

O extrato bruto foi obtido da polpa do fruto (1052 g) do abacaxi cultivar Pérola. Após retirada das cascas e talos o fruto foi macerado e filtrado 2 vezes em algodão, resultando no volume final de 630 mL (Figura 2).

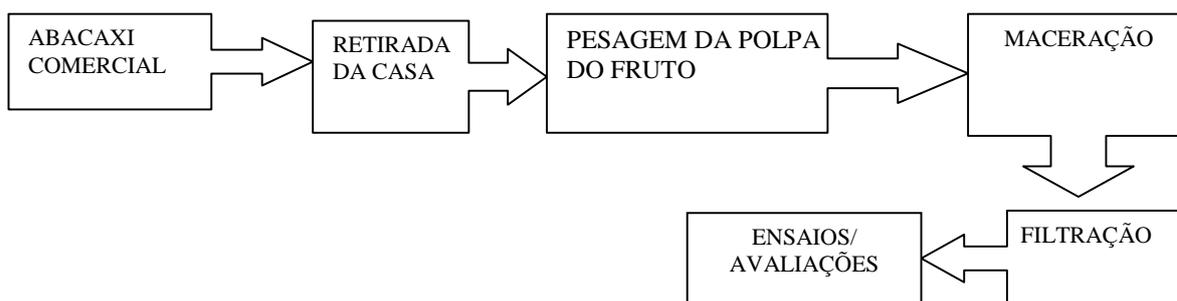


Figura 2 – Fluxograma da obtenção do extrato bruto da enzima bromelina a partir do fruto de abacaxi cultivar Pérola.

4.2 Determinação de concentração de proteínas totais

4.2.1 Determinação do conteúdo protéico pelo método modificado

A determinação da concentração da proteína total foi realizada utilizando o método de BRADFORD (1976) com modificações. O procedimento de análise foi realizado da seguinte forma: em um tubo de ensaio colocou-se 20 μL da amostra e 980 μL de água destilada, acrescentou-se 1000 μL do reagente, agitou-se o tubo em vórtex, deixando-se em repouso por cinco minutos. Em seguida realizou-se a leitura de absorvância a 595 nm. As análises foram feitas em triplicatas. O branco foi preparado com 1000 μL de água destilada e 1000 μL do reagente.

Para os cálculos da concentração de proteína, fez-se uma curva de calibração utilizando soluções de Albumina de Soro Bovino (BSA) com concentrações variando de 2,5 a 40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

4.2.2 Determinação do conteúdo proteico

A determinação da concentração da proteína total foi realizada utilizando o método de BRADFORD (1976). O procedimento de análise foi realizado da seguinte forma: em um tubo de ensaio colocou-se 100 μL da amostra e 2,5 mL do reagente, agitou-se o tubo em vórtex, deixando-se em repouso por cinco minutos. Em seguida, realizou-se a leitura em espectrofotômetro Femto, modelo 800 XI com absorvância a 595 nm. As análises foram feitas em triplicata. O branco foi preparado com 100 μL de água destilada e 2,5 mL do reagente de Bradford.

Para os cálculos da concentração de proteína, utilizou-se uma curva padrão de Albumina de Soro Bovino (BSA) com concentrações variando de 2,5 a 50 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$.

4.3 Método de determinação da atividade enzimática

4.3.1 Determinação da atividade enzimática segundo Kunitz (1947)

Em tubo de ensaio (bioreatores) foram adicionados 5 mL de caseína e 0,2 mL do extrato proteico, seguido de vigorosa agitação. Imediatamente (tempo 0 da reação) retirou-se uma alíquota de 0,02 mL da amostra, adicionou-se 0,98 mL de água destilada e 1 mL do reagente de Bradford. Após agitação em vórtex e incubação a temperatura ambiente por 5 min realizou-se leitura de absorvância em espectrofotômetro a 595 nm. Após 20 min de reação retirou-se mais uma alíquota de mesmo volume do biorreator e foi realizado o teste de Bradford como descrito acima.

A atividade enzimática foi calculada como mostrado na equação 1.

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

Onde A_{ENZ} é a atividade enzimática da enzima expressa em $[\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}]$ ou $[\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}]$, d é o fator de diluição (volume total/volume da alíquota), MM_{PD} a massa molar da proteína degradada $[\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}]$, V o volume de enzima $[\text{mL}]$, V_{reator} o volume do reator $[\text{mL}]$, $Abs_{inicial}$ e Abs_{final} são as leituras inicial e final de absorvância, t_1 o tempo para degradação da proteína $[\text{min}]$ e C_{lin} e C_{ang} os coeficientes linear e angular da curva de calibração do reagente Bradford.

4.3.2 Determinação da atividade enzimática segundo Kunitz (1947) e Walter (1984)

A determinação da atividade proteolítica pode ser realizada conforme modificações das metodologias propostas por Kunitz (1947) e Walter (1984), como descrito a seguir:

A. Reagentes

1. Solução estoque de tirosina (5 mmol/L): dissolver 45,3 mg de tirosina em 50 mL da solução de HCl (5) – S₀. Diluir para 3 (P₀), 2 (P₁), 1 (P₂), 0,5 (P₃) e 0,25 (P₄) mM com a solução (5). Homogeneizar a solução antes de diluir.

B. Procedimento

1. Pipetar em tubos de centrífuga separados: 2,5 mL de solução de substrato (4.1) nos tubos T e B₃, 2,5 mL de solução de HCl (5) em B₁ e B₂ e 2,5 mL de cada solução padrão de tirosina (6) (Padrões - P₀, P₁, P₂, P₃, P₄).
2. Deixar em banho por 3 a 5 minutos em temperatura de 37 °C.
3. Adicionar 0,2 mL da amostra (enzima) aos tubos T e B₁, e 0,2 mL de HCl 0,05 M (5) aos demais.
4. Misturar e deixar incubando por 10 minutos a 37 °C.
5. Ao fim do tempo adicionar 5 mL de TCA (7a).
6. Misturar e adicionar 0,2 mL de amostra ao branco.
7. Deixar em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Remover o precipitado por filtração ou centrifugação por 20 minutos a 4000 g (centrífuga Fanem em velocidade 10 por 20 minutos).

C. Medida da Atividade

Ler a variação de absorvância a 280 nm (no filtrado ou sobrenadante).

- Absorvância da amostra: A_T
- Absorvância do branco B₁: A_{B1}
- Absorvância do branco B₃: A_{B3}

- Através de $A_T - A_{B1} - A_{B3}$, encontra-se, na curva de calibração, a concentração de tirosina, C_{tir} , produzida pela ação da protease presente em 0,2 mL de amostra em 10 minutos a 37 °C.

O resultado final, em atividade enzimática, é dado por:

$$\text{Atividade} = 0,02 \cdot C_{tir} \text{ (}\mu\text{mol/min)} \quad (2)$$

4.4 Determinação da atividade enzimática

A atividade específica, A_{Esp} [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$] ou [$U\cdot\text{mg}^{-1}$], foi expressa como unidades de enzima por quantidade de proteína total, $C_{proteína}$ [$\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$], conforme a Equação 3.

$$A_{Esp} = \frac{A_{ENZ}}{C_{proteína}} \quad (3)$$

4.5 Purificação da bromelina para caracterização do pH e temperatura ótima – Protocolo 1

Em todas as fases da purificação foram determinadas as atividades de Bromelina e concentração total de proteína.

ETAPA 1 – após a maceração da polpa do fruto, 630 mL do suco (extrato proteico) foi submetido a precipitação com sulfato de amônio sólido (80% de saturação). A adição foi realizada lentamente, sob agitação em banho gelo, até completa dissolução do sulfato de amônio. Após a dissolução, deixou-se a suspensão sob agitação a 4°C, por mais 2 horas. A solução foi centrifugada por 15 min, 12500 rpm, em centrífuga sorvall modelo Avanti J-25.

ETAPA 2 – após centrifugação, o precipitado resultante foi ressuspenso em 10 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 5,7, e dialisado por 19 horas a 4°C contra o mesmo tampão, com duas trocas de 12 e 7 horas, respectivamente.

ETAPA 3 – O precipitado ressuspenso em tampão fosfato de sódio 50 mM foi concentrado por liofilização por 72 horas.

ETAPA 4 – o liofilizado foi ressuspenso em 8 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 5,7, e fracionado em uma coluna de vidro com dimensões de 1,5 x 48 cm contendo a resina Sephadex G-100 Pharmacia Biotec®. Essa resina é usada para fracionar moléculas de 4.000 a 150.000 Da. A coluna foi previamente equilibrada com 5 vezes o volume da coluna (250 mL) de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 5,7. Foram coletadas 46 frações de 3 mL com um fluxo de 15 mL/hora.

ETAPA 5 – a fração de número 3 foi caracterizada quanto o seu pH e temperatura ótima.

4.6 Purificação da bromelina para caracterização dos parâmetros cinéticos

4.6.1 Precipitação fracionada com sulfato de amônio

Em todas as fases da purificação foram determinadas as atividades de Bromelina e concentração total de proteína.

ETAPA 1 – A polpa do fruto foi macerada. Após maceração o extrato bruto proteico foi submetido a precipitação com sulfato de amônio sólido (20% de saturação). A adição foi realizada lentamente, sob agitação em banho gelo, até completa dissolução do sulfato de amônio. Após a dissolução, deixou-se a suspensão sob agitação a 4°C, por

mais 2 horas. A solução foi centrifugada por 15 min, 12500 rpm, em centrífuga sorvall modelo Avanti J-25.

ETAPA 2 – após centrifugação, o precipitado resultante foi ressuspendido em 2,8 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 5,7, e o sobrenadante foi submetido a precipitação com sulfato de amônio sólido (40% de saturação). A adição foi realizada lentamente, sob agitação em banho gelo, até completa dissolução do sulfato de amônio. Após a dissolução, deixou-se a suspensão sob agitação a 4°C, por mais 2 horas. A solução foi centrifugada por 15 min, 12500 rpm, em centrífuga sorvall modelo Avanti J-25.

ETAPA 3 – após centrifugação, o precipitado resultante foi ressuspendido em 5 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 5,7, e o sobrenadante foi submetido a precipitação com sulfato de amônio sólido (60% de saturação). A adição foi realizada lentamente, sob agitação em banho gelo, até completa dissolução do sulfato de amônio. Após a dissolução, deixou-se a suspensão sob agitação a 4°C, por mais 2 horas. A solução foi centrifugada por 15 min, 12500 rpm, em centrífuga sorvall modelo Avanti J-25.

ETAPA 4 – após centrifugação, o precipitado resultante foi ressuspendido em 7 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 5,7, e o sobrenadante foi submetido a precipitação com sulfato de amônio sólido (80% de saturação). A adição foi realizada lentamente, sob agitação em banho gelo, até completa dissolução do sulfato de amônio. Após a dissolução, deixou-se a suspensão sob agitação a 4°C, por mais 2 horas. A solução foi centrifugada por 15 min, 12500 rpm, em centrífuga sorvall modelo Avanti J-25.

ETAPA 5 – O precipitado resultante da precipitação com sulfato de amônio (80% de saturação) foi ressuspendido em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 5,7, e dialisado por 19 horas a 4°C contra o mesmo tampão, com duas trocas de 12 e 7 horas, respectivamente.

ETAPA 6 – após diálise, verificou-se que a maior parte de Bromelina estava concentrada no precipitado, e o sobrenadante foi descartado.

4.6.2 Cromatografia de troca iônica

ETAPA 1 – Após o procedimento descrito no item 4.6.1, 1 mL do precipitado com sulfato de amônio 80% de saturação foi fracionado em cromatografia de troca iônica (0,7 x 41 cm) com resina CM-Sephadex C-50 Pharmacia Biotec[®], previamente equilibrada com 5 vezes o volumes da coluna (120 mL) de tampão citrato 20 mM a pH 3,6. Foram coletadas 40 frações de 3 mL cada uma. Após a coleta das frações, foi realizada a eluição por aumento da força iônica adicionando-se 50 mL de cada solução de NaCl 0,1-0,5 M no tampão citrato. Foram coletadas mais 42 frações de 3 mL com um fluxo de 26mL/hora, sendo adicionado continuamente solução de NaCl em ácido cítrico em diferentes concentrações (0,1 – 0,5 M).

4.7 Cromatografia em coluna de sephadex G-100

ETAPA 1 – Como descrito no item 4.6.1, o precipitado com sulfato de amônio 80% de saturação foi fracionado em coluna Sephadex G-100 (1 x 48 cm), previamente equilibrada com 5 vezes o volumes da coluna (250 mL) com tampão fosfato de sódio 50 mM a pH 5,7.

ETAPA 2 – Após equilíbrio, 1 mL da solução de *blue dextran* foi aplicada no topo da coluna e frações de 1 mL foram coletas. As frações foram coletadas até o último volume da solução. Em seguida, realizou-se a leitura em espectrofotômetro Femto, modelo 800 XI com absorbância a 280 nm. Observou-se o volume vazio de 19 mL.

ETAPA 3 – Após a determinação do volume vazio, 2,8 mL do concentrado foram aplicados na coluna, contendo a resina Sephadex G-100 Pharmacia Biotec[®]. Foram coletadas 40 frações de 3 mL com um fluxo de 18 mL/hora.

4.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE)

A eletroforese foi realizada de acordo com Laemmli (1970) para observação do grau de purificação da bromelina em gel de corrida de 12%. As amostras protéicas em tampão de amostra contendo azul de bromofenol foram levadas a ebulição durante 5 minutos e então aplicadas ao gel.

Os géis foram preparados a partir da solução estoque de acrilamida/N,N-metileno bisacrilamida (bis) 30% (p/v), tampão Tris/HCl 1,5 M, pH 8,8, para o gel de corrida, e tampão Tris/HCl 1,0 M, pH 6,8, para o gel concentrador, persulfato de amônio 10% (p/v), dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% (p/v) e N,N,N,N-tetrametiletilenodiamino (TEMED). A corrida eletroforética foi realizada em sistema vertical modelo TV100 (Scie-Plas) a temperatura ambiente com voltagem constante de 60V por 4 horas até que a frente de corrida chegasse ao fim do gel. Foram aplicadas no gel alíquotas contendo 10 µg de proteína. O marcador de massa molecular usado foi Sigmamarker (6,5 KDa – 200 KDa). Após a eletroforese, o gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250* durante 12 horas. Em seguida, o gel foi submetido a duas lavagens com água destilada e descorado com uma mistura de 30% de metanol e 10% de ácido acético.

4.9 Caracterização da bromelina

A caracterização foi realizada para o extrato protéico bruto (suco) e as frações resultantes da purificação pelos métodos de cromatografia de gel-filtração.

Os métodos de purificação e caracterização utilizados seguiram o fluxograma apresentado na (Figura 3).

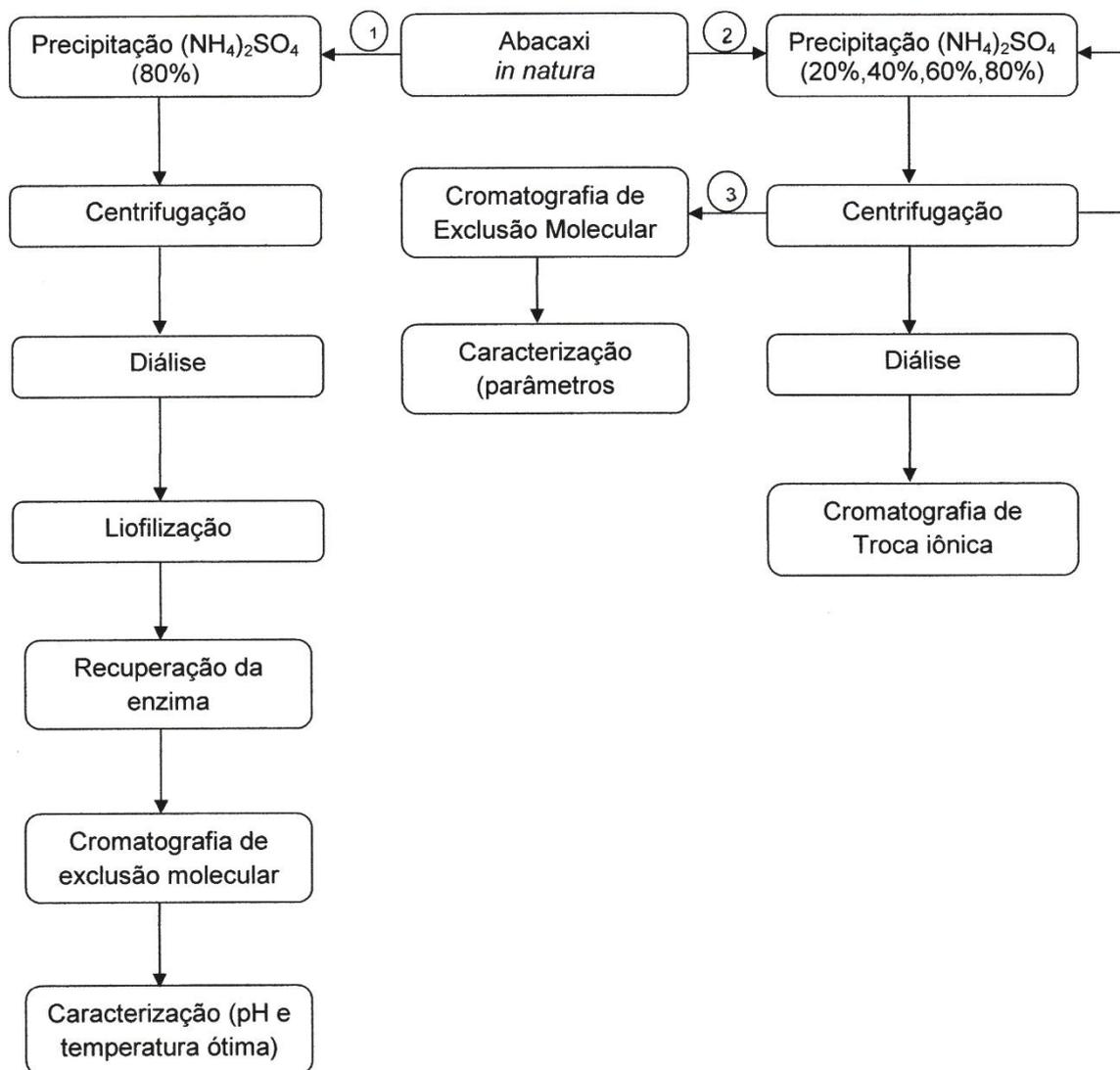


Figura 3 – Fluxograma da purificação e caracterização da enzima bromelina.

4.9.1 Temperatura ótima de atividade

A determinação da atividade da bromelina em função da temperatura foi realizada incubando-se a mistura de reação em banho-maria, por 20 minutos, com temperatura variando de 20°C a 70°C, com intervalos de 10°C. A atividade foi determinada como descrita no item 4.3.1.

4.9.2 pH ótimo de atividade

A atividade da bromelina foi avaliada em diferentes valores de pH, sob temperatura ambiente usando a caseína como substrato. O efeito do pH na atividade enzimática foi medido usando diferentes tampões a 50 mM, tampão acetato de sódio (pH 3,0 a 6,0); tampão fosfato de sódio (6,0 e 7,0) e tampão Tris-HCl (pH 8,0 e 9,0) na concentração de 50 mM, com intervalos de 1 unidade de pH. A atividade foi determinada como descrita no item 4.3.1.

4.9.3 Detreminação dos parâmetros cinéticos K_{mapp} e V_{maxapp}

Os valores de K_{mapp} , e V_{maxapp} foram determinados com base nas velocidades iniciais de reação em presença do substrato tamponado, variando de 0,1 a 1%. Os parâmetros cinéticos foram calculados por regressão não-linear usando o programa GraphPad Prism.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da atividade da enzima, atividade específica, concentração de proteína total e recuperação de todas as etapas da purificação são apresentadas na (Tabela 3).

Tabela 3 – Purificação da bromelina do fruto do abacaxizeiro (protocolo 1).

Etapa de purificação	Proteína total (mg)	Atividade enzimática (U)	Atividade específica (U/mg)	Fator de Purificação
Suco do abacaxi	2076,48	6331,5	3,05	1
Precipitação (NH ₄) ₂ SO ₄ 0-80% saturação	778,45	56,09	0,072	0,024
Fração 1	3,9	95,334	24,634	8,076
Fração 3	32,04	162,933	5,085	1,667

O maior teor de proteína total foi encontrado no suco, seguido pela precipitação de 80% com sulfato de amônio. Isso pode ter acontecido, provavelmente, pela precipitação das proteínas presentes, enquanto que os outros componentes permaneceram no sobrenadante. Embora desejava-se obter apenas proteínas que é de grande interesse, o suco também contém outros constituintes, por exemplo, carboidratos, gomas e outras substâncias, elevando assim, sua absorvância pelas interferência dos mesmos.

Desta maneira, outros estudos foram realizados na determinação de proteínas totais do suco do abacaxi. Por exemplo, Gharbawi & Whitaker (1963) determinaram a concentração de proteína pelo método do Biureto (1980), e encontraram valores entre 28,7 e 31,70% de proteína para a bromelina do caule de abacaxi de variedade não mencionada, no entanto, Awang & Razak (1978) encontraram resultados de proteína na bromelina do caule em torno de 65,25%, ambos utilizaram como agente precipitante o álcool etílico p.a e os resultados apresentados foram superiores aos do presente trabalho.

Os resultados mais elevados da atividade enzimática específica obtidos neste trabalho ocorreram nas fração 1 (24,63 U.mL⁻¹), seguido pela fração 3 (5,08 U.mL⁻¹) da cromatografia, colaborando assim, para o aumento no fator de purificação das mesmas. O precipitado resultante da precipitação com sulfato de amônio a 0-80% apresentou maior fator de purificação na fração 1, seguido pela fração número 3 da cromatografia. Ao final do processo, observa-se que houve um aumento de 8 vezes no valor do fator de purificação da fração 1 e de 1 ½ na fração 3. Embora o fator de purificação obtido na fração 3 seja considerado o menor, a mesma foi usada para a caracterização. Isso aconteceu devido a fração 1 obter menor quantidade de atividade enzimática. No entanto, o valor de atividade específica foi maior no suco do abacaxi quando comparado com o precipitado. Provavelmente, os resultados indicam que a precipitação por sulfato de amônio na saturação a 0-80% não é a técnica mais efetiva para os passos iniciais da purificação.

Esses resultados estão de acordo com um estudo que objetivou a comparação de duas técnicas de precipitação fracionada, precipitação por sulfato de amônio e a precipitação por acetona gelada, resultados mais efetivos na manutenção dos valores de atividade proteolítica da bromelina foram obtidos nas frações 20–50% e 50-75% de saturação do sulfato de amônio, quando comparadas à precipitação por acetona gelada (COSTA *et al.*, 2008).

Devakate *et al.* (2009), estudaram o efeito do percentual de saturação na bromelina. Os resultados obtidos mostraram que a fração coletada a 40-60% e 60-80% de satu-

ração por sulfato de amônio encontrou alto valor de atividade específica quando comparado a outros níveis de saturação. No entanto, o extrato bruto apresentou maior valor de atividade específica ($58,8 \text{ U.mg}^{-1}$) quando comparado com a fração com percentual de saturação 0-80% ($16,4 \text{ U.mg}^{-1}$), também concordando com os resultados encontrado nesse presente trabalho.

A bromelina da espécie *Ananas comosus* foi parcialmente purificada a partir do precipitado do suco do abacaxi cultivar Pérola. Considerando que a bromelina possui massa molecular aproximada de 31 KDa, foi utilizada a resina Sephadex G-100, que fraciona proteínas com massa molecular entre 4 e 150 KDa de proteínas totais. A fração resultante da precipitação com sulfato de amônio a 0-80% de saturação foi submetido a cromatografia de gel filtração. Foram coletadas 46 frações de 3mL, sendo que as frações iniciais mostraram maior concentração de proteína total, ou seja, foram detectados dois picos quando procedeu-se a leitura em 280 nm (Figura 4). O primeiro pico de atividade específica da bromelina apresentou-se nas primeiras frações, sendo o terceiro pico detectado na fração correspondente ao número 37.

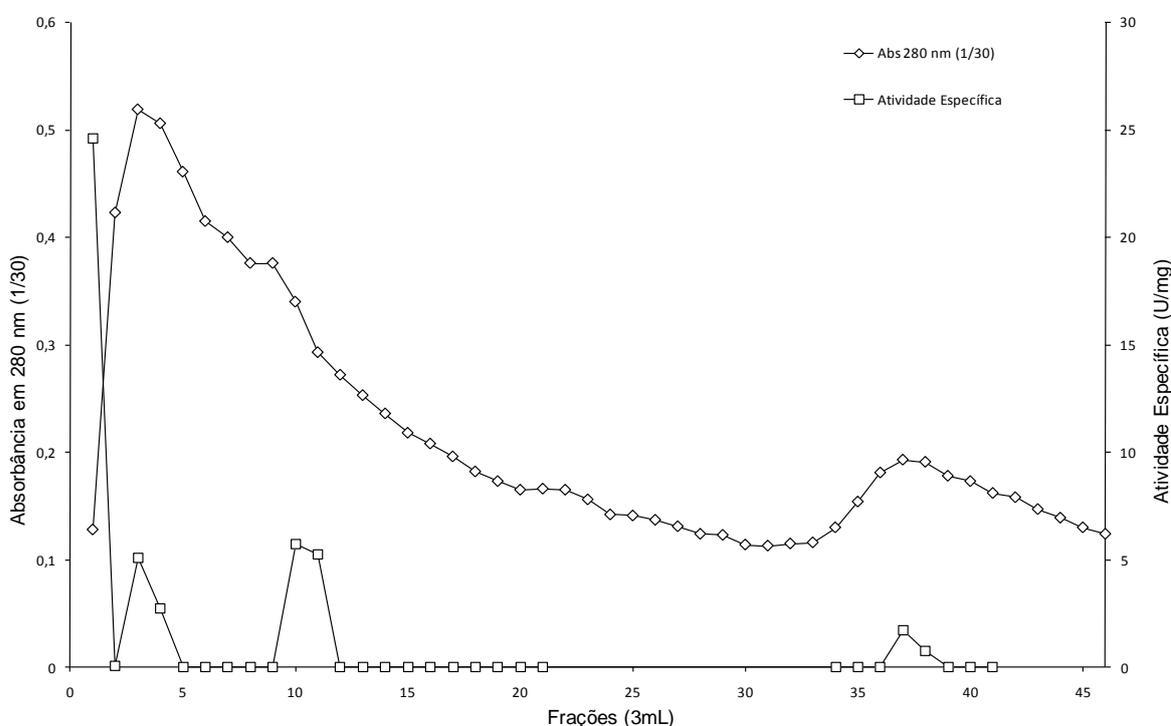


Figura 4 – Perfil cromatográfico da atividade específica e absorbância da bromelina em coluna de gel-filtração Sephadex G-100.

Das proteases isoladas a partir de plantas da família Bromeliaceae as mais estudadas e melhor caracterizadas são as obtidas de *Ananas comosus* L. Merril. Neste estudo foi realizada a caracterização bioquímica quanto ao pH ótimo e temperatura ótima da enzima bromelina proveniente do extrato bruto protéico da fração número 3 da cromatografia usando Sephadex G-100. Esta última apresenta-se parcialmente purificada.

O pH é um parâmetro que exerce grande influência na manutenção da atividade enzimática. O efeito deste fator se dá devido a alterações no estado de ionização dos componentes do sistema, em consequência da variação da concentração de H^+ (RICARDO & TEIXEIRA, 1993). Segundo Peter *et al.* (1987), os sítio ativos e reguladores das enzimas sofrem grande influência da concentração de íons de hidrogênio fazendo com que estas modifiquem suas estruturas conformacionais. Estas modificações podem atingir o centro ativo de modo a melhorar a sua atividade catalítica ou fazer com que haja a desnaturação total ou parcial das enzimas, que é um processo irreversível, ou seja,

mesmo ajustando o pH para o valor original não se obtém a restauração da atividade nem das constantes cinéticas.

A bromelina do suco do abacaxi (extrato protéico bruto) apresentou pH ótimo de ação igual a faixa 5,0, como é mostrado na Figura 5. Contrário ao resultado encontrado por Ko & Kang, (1990), Rowan *et al.* (1990), Suh *et al.* (1992), obtendo o pH ótimo para enzima 7,5. A enzima bromelina parcialmente purificada (Figura 6) apresentou pH ótimo igual ao da enzima no extrato protéico bruto (Figura 5).

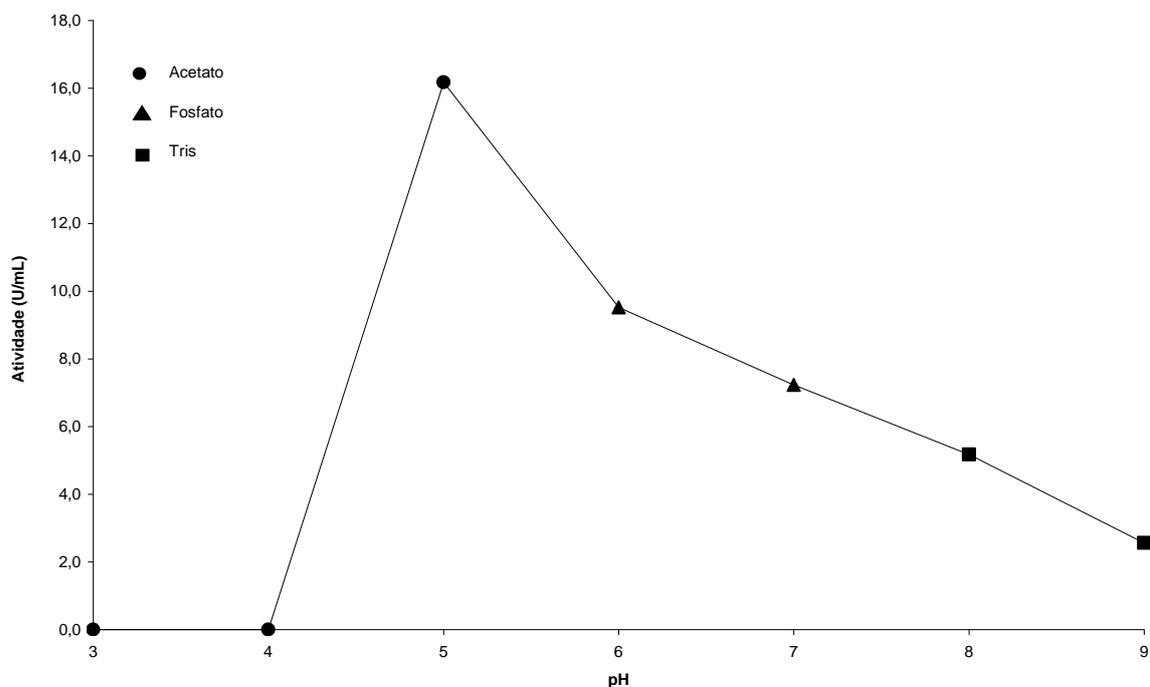


Figura 5 – Influência do pH na atividade proteolítica no extrato bruto protéico.

Hernández *et al.* (1998), estudaram a influência do pH (5,7; 6,7 e 7,7) na extração de enzimas proteolíticas a partir de talos de *Ananas comosus*. Os maiores valores de atividade enzimática e atividade específica foram obtidos quando a extração se realizou a pH ácido, resultados similares aos mostrados neste trabalho, no qual se demonstrou que os rendimentos dependem do pH e são favorecidos quando o procedimento de extração se realiza a partir da polpa de abacaxi a pH 5,0. Isto sugere que as proteases presentes nesta parte da planta são mais ativas a valores de pH ácido.

Estes dados são de extrema importância na estratégia de purificação da enzima bromelina, evitando a perda de atividade pelo uso de faixas de pH agressivos às enzimas e a redução na eficiência do método empregado (BIAZUS, 2006).

A influência do pH ótimo sobre a atividade da enzima bromelina na fração 3 após cromatografia de gel-filtração é mostrada na Figura 6. Silva *et al.* (2006), estudou o efeito de pH utilizando tampões 100 mM de citrato de sódio (pH de 5,0 a 5,8); fosfato de sódio (pH de 6,0 a 7,0) e Tris-HCl (pH 7,2 a 9,0), obtendo pH ótimo para atividade proteolítica da bromelina, 7,2.

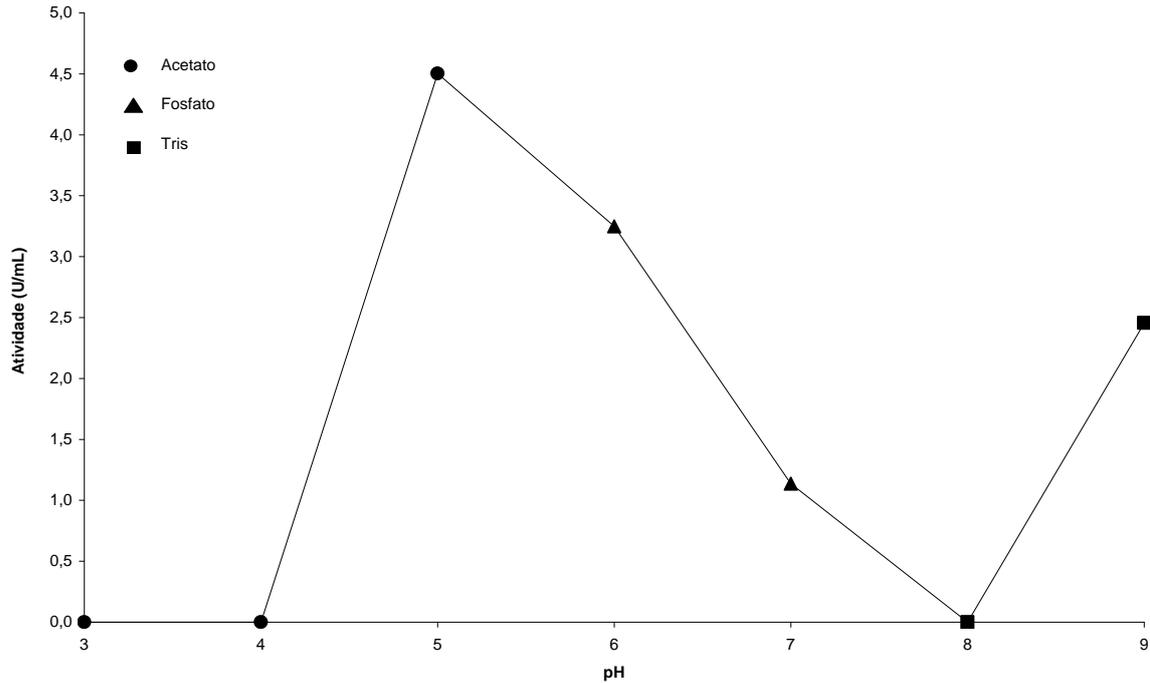


Figura 6 – Influência do pH na atividade proteolítica da bromelina determinado na fração 3 obtida após cromatografia de gel-filtração em coluna Sephadex G-100.

A temperatura é um dos agentes críticos sobre a atividade das enzimas. Quando se eleva a temperatura, a atividade aumenta, todavia, o processo de desnaturação cresce devido à ação do calor (HALPERN, 1997).

Rowan *et al.* (1990) e Suh *et al.* (1992) caracterizaram a bromelina do talo, que apresentou atividade máxima a 60 °C. Rasheedi *et al.* (2003) também caracterizaram a bromelina do talo e encontraram temperatura ótima de 37 °C. Do mesmo modo, Khan *et al.* (2003) encontraram temperatura ótima de 37 °C. No entanto, Ko *et al.* (1990) encontraram temperatura ótima de 62,5 °C.

A Figura 7 descreve o perfil da atividade proteolítica da enzima bromelina a diferentes temperaturas. Percebeu-se que a atividade foi baixa à temperaturas de 20 a 30 °C. A 40 °C houve uma elevação significativa da atividade, seguida de um decréscimo da atividade na temperatura entre 50 e 70°C, ou seja, a atividade ótima de ação do suco do abacaxi foi 40°C.

Brito *et al.* (2007), estudou a influência da temperatura ótima na peroxidase do abacaxi IAC Gomo-de-mel, a qual apresentou temperatura ótima na faixa de 45° a 50°C.

De modo geral, temperaturas elevadas de uma ou duas dezenas de graus acima da temperatura do meio natural das enzimas, conduzem freqüentemente, à perda de atividade (HALPERN, 1997), resultado que pode ser verificado na Figura 7.

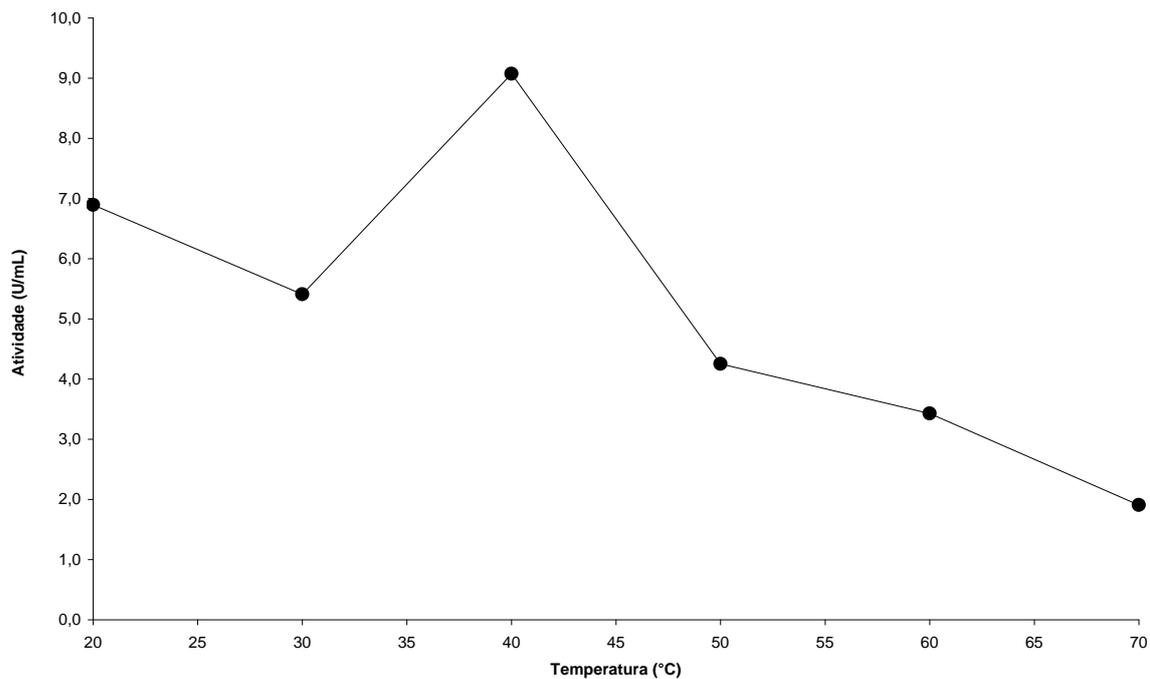


Figura 7 – Influência da temperatura na atividade proteolítica da bromelina no extrato bruto protéico.

A bromelina presente no suco do abacaxi (Figura 7) apresentou temperatura ótima menor que a da enzima presente na fração número 3 (Figura 8).

A atividade ótima de ação da fração 3, da cromatografia de gel filtração, foi 60°C. Abaixo e acima de 60°C, a atividade da bromelina foi baixa, como mostra a Figura 8. Mesma temperatura ótima foi encontrada por Silva *et al.* (2006), Rowan *et al.* (1990) e Suh, *et al.* (1992). Embora a temperatura ótima encontrada por Silva *et al.* (2006), seja 60°C observou-se nesse estudo que a 50°C a enzima já apresentava 90,1% de sua atividade máxima, e que era desnaturada acima de 60 °C.

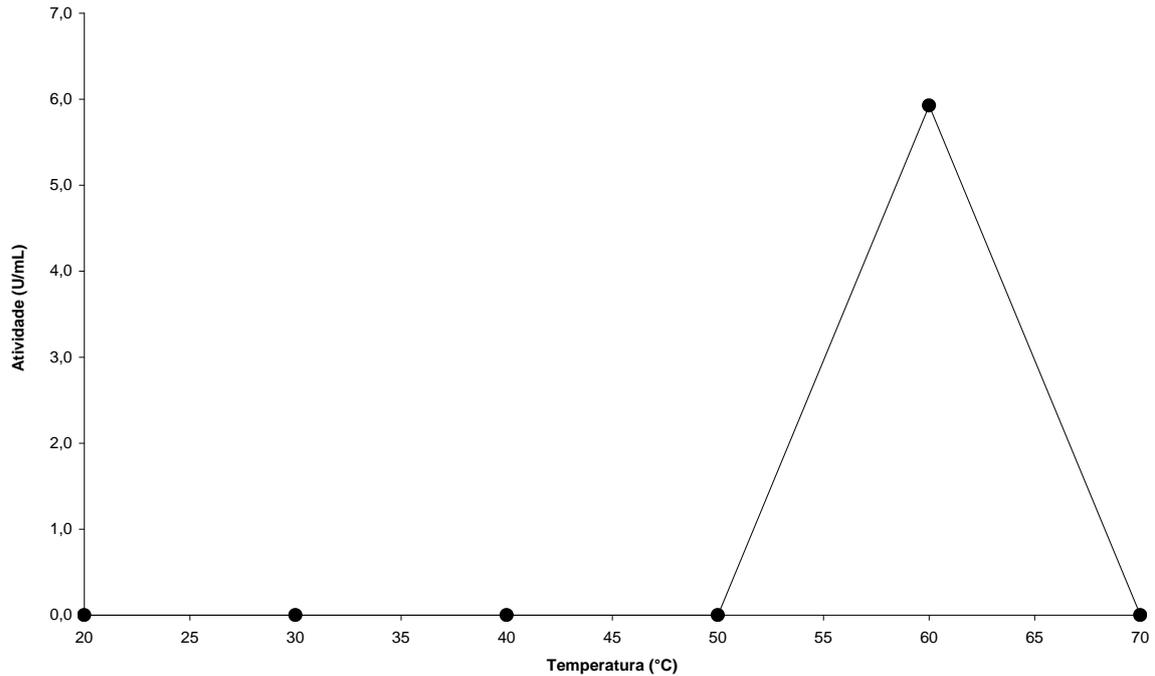


Figura 8 – Influência da temperatura na atividade da bromelina determinado na fração 3 obtida após cromatografia de gel-filtração em coluna Sephadex G-100.

As preparações enzimáticas das diferentes etapas de purificação foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, como mostra as (Figura 9) e (Figura 10).

A análise do perfil protéico por SDS-PAGE 12 % demonstrou que o suco, o precipitado a 80% e todas as frações 1-15 apresentaram bandas com peso molecular igual ao relatado para a bromelina (Figura 9) e (Figura 10), com exceção do sobrenadante, o qual não foi possível observar bandas, provavelmente devido todas as suas proteínas solúveis terem sido precipitadas. No entanto, merecem destaque as frações 1–4, 10, 11, 37 e 38, uma vez que, além de possuírem bandas com o mesmo peso molecular, apresentaram maiores valores de atividade proteolítica, podendo ser um indicativo provável de maior concentração desta enzima nessas frações. Dessa forma, levando-se em conta o grau de pureza das enzimas proteolíticas necessária, a utilização dessas frações para purificação da bromelina foi similar ao da literatura consultada, resultados similares foram encontrados por Campos (2007), 32,2 kDa; Silverstein e Kezdy (1975), 35 kDa; e Mura-chi (1976), 33 kDa. Porém, Ota *et al.* (1972), Takahashi *et al.* (1973), Wharton (1974), e Suh *et al.* (1992) acharam diferentes peso molecular para bromelina, 28 kDa, 28 kDa, 28.4 kDa, e 37 kDa, respectivamente.

Confirmou-se, por análise em eletroforese, que a enzima bromelina possui baixo peso molecular de aproximadamente 31 kDa, confirmando estudo realizado por Martins *et al.* (1992), este relatou que a Bromelina possui peso molecular de 31 kDa. Por outro lado, Lopes *et al.* (2009) realizaram recentemente estudos usando SDS-PAGE, e observaram que o extrato purificado da polpa do *A. comosus* possui baixo peso molecular de 24,5 kDa.

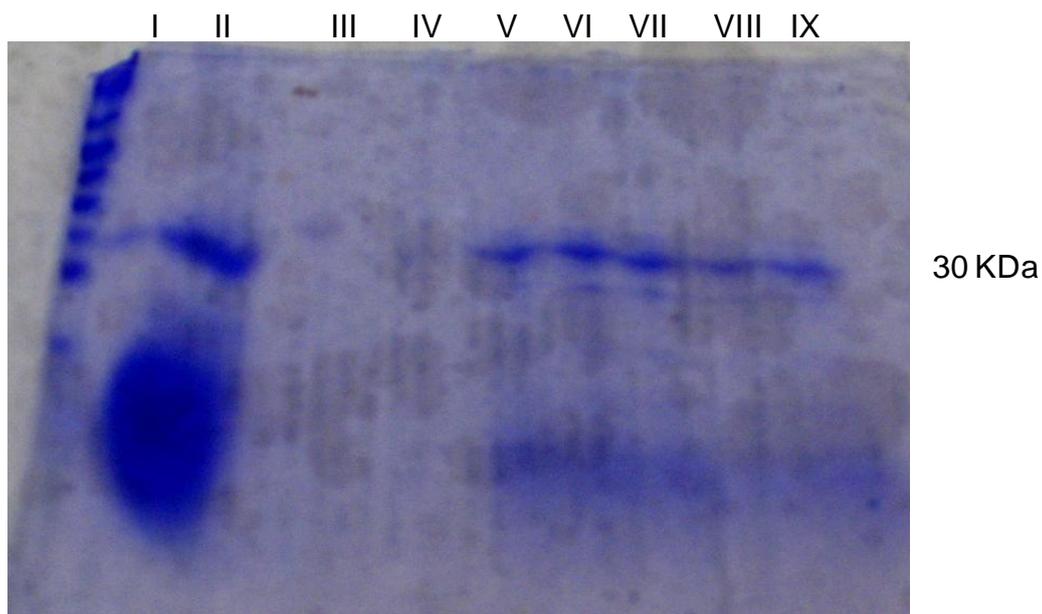


Figura 9 – Eletroforese em gel de poliacrilamida. I-Suco, II- precipitado, III-Sobrenadante, IV-Fração 1, V-Fração 2, VI-Fração 3, VII-Fração 4, VIII-Fração 5 e IX-Fração 6.

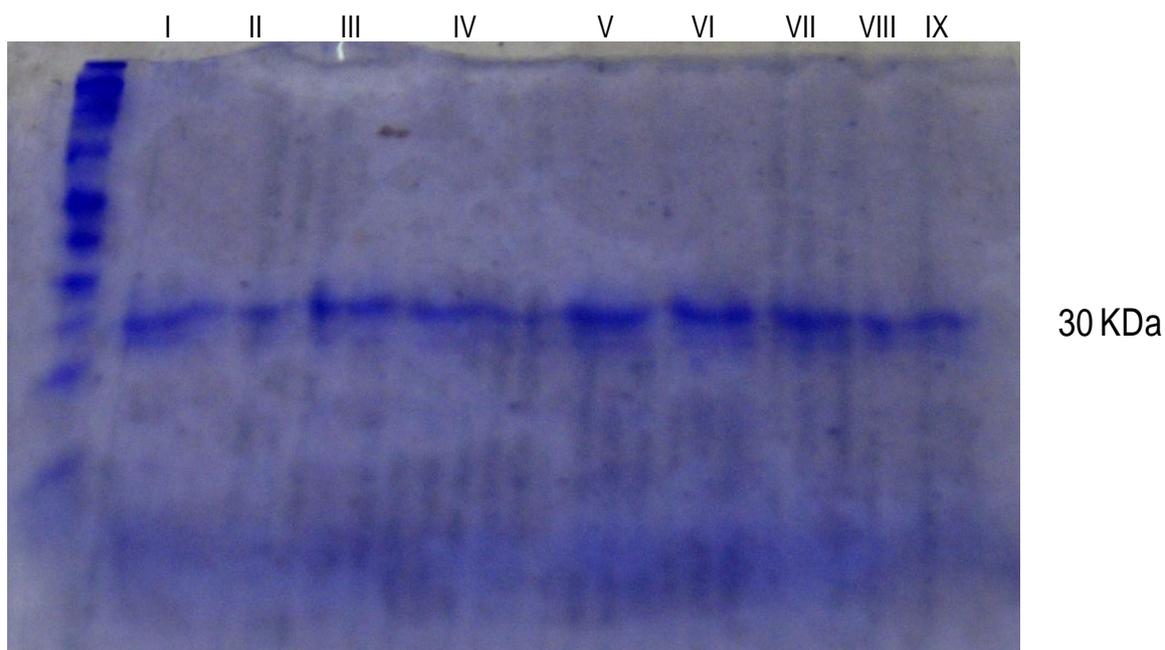


Figura 10 – Eletroforese em gel de poliacrilamida. I-Fração 7, II- Fração 8, III- Fração 9, IV- Fração 10, V-Fração 11, VI-Fração 12, VII-Fração 13, VIII-Fração 14 e IX- Fração 15.

Com o objetivo de se obter melhor purificação da bromelina, outros protocolos de purificação foram testados. Inicialmente foi realizada a precipitação fracionada com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, visando à obtenção de maior purificação do que observado inicialmente quando foi realizada a precipitação diretamente com 80 % de saturação. Na Tabela 4 estão apresentados os resultados da precipitação fracionada.

Tabela 4 – Precipitação fracionada da bromelina com sulfato de amônio (protocolo 2).

Etapa de purificação	Proteína total (mg)	Atividade enzimática (U)	Atividade específica (U/mg)	Fator de Purificação
Extrato bruto protéico	2033,13	32,94	0,016	1
F 0-20%	52,827	4,113	0,078	4,9
F 20-40%	272,500	12,17	0,045	2,8
F 40-60%	178,73	12,649	0,071	4,40
F 60-80%	60,5	10,81	0,179	11,00
F 80%	74,58	0	0	0

Observa-se que houve um crescimento do fator de purificação da bromelina nas diferentes porcentagens de saturação com o sulfato de amônio com relação ao extrato bruto protéico, com exceção do sobrenadante de F80%. Como era esperado, o precipitado de 60-80% apresentou um maior fator de purificação quando comparado as demais precipitações. Isso pode ter acontecido, possivelmente, pelo aumento da extração e concentração da enzima como relação às fases de precipitação fracionada. O precipitado obtido da precipitação fracionada de F60-80% foi, então, escolhido para a continuidade do trabalho, uma vez que apresentou maior atividade específica. O precipitado ressuspenso em 2,5 mL de tampão fosfato foi aplicado na coluna de cromatografia de troca catiônica por possuir menor volume e após análise do perfil protéico por SDS-PAGE (Figura 11) que indicou bandas limpas e visíveis próximas ao peso molecular esperado (28-32 kDa). Com relação aos resultados obtidos da precipitação, pode-se observar um decréscimo de concentração de proteína total dos sobrenadantes com os intervalos de saturação. No entanto, o precipitado de F60-80% apresentou maior atividade específica quando comparado com o precipitado de F0-20%. Os resultados apresentados no presente trabalho corrobora com estudo feito por Costa *et al.* (2008), que relatou maior atividade específica na precipitação por sulfato de amônio na fração 50-75% de saturação.

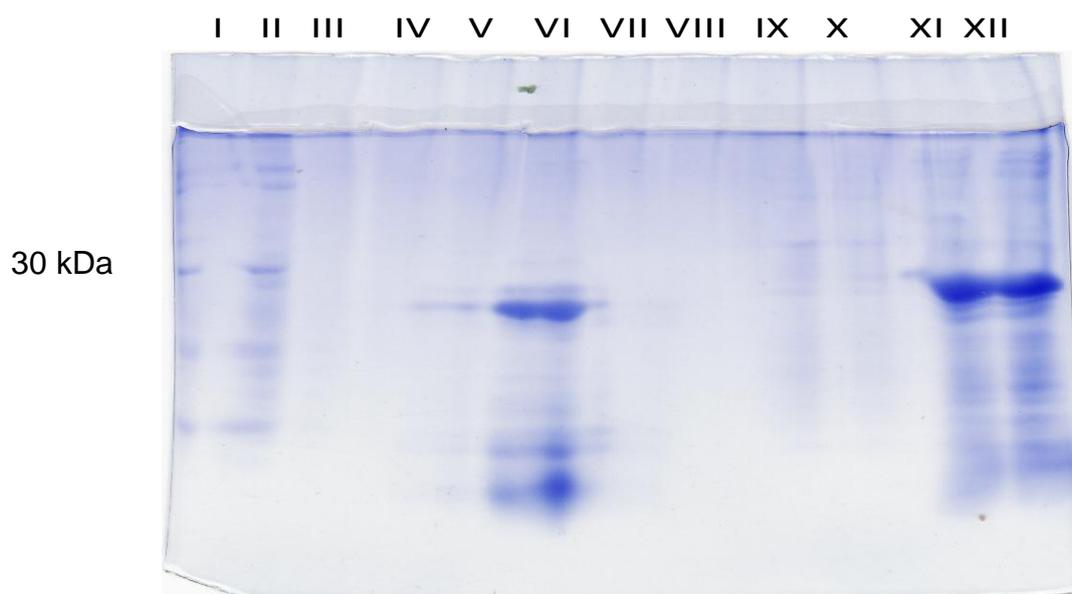


Figura 11 – Eletroforese em gel de poliacrilamida. I- Marcador molecular, II- Marcador molecular, III- Sobrenadante de 60% (30 µg), IV- Sobrenadante de 60% (30 µg), V- Sobrenadante de 60% (50 µg), VI- Precipitado de 60% (30 µg), VII- Precipitado de 60%

(30 µg), VIII- Precipitado de 60% (50 µg), IX- Sobrenadante de 80% (30 µg), X- Sobrenadante de 80% (50 µg), XI- Precipitado de 80% (30 µg) e XII- Precipitado de 80% (50 µg).

Após definição de que a precipitação fracionada com 60-80% de saturação resultava em maior purificação, foi testada a combinação desse método com a cromatografia de troca iônica (protocolo 2 de purificação). Os resultados desse protocolo são apresentados na Tabela 5.

A Tabela 5, mostra que o fator de purificação foi alto para a fração 1. No entanto, merece destaque a fração 2 (Figura 12), uma vez que, possui alto valor de atividade específica, podendo ser um indicativo de provável maior concentração desta enzima nesta fração. Dessa forma, levando-se em conta o grau de pureza das enzimas proteolíticas necessário, a utilização dessa fração 1 para uso ou para posterior purificação da bromelina deve ser averiguada.

Tabela 5 – Purificação da bromelina do fruto do abacaxizeiro (protocolo 2).

Etapa de purificação	Proteína total mg	Atividade enzimática U	Atividade específica (U/mg)	Fator de Purificação
Suco	2033,13	32,94	0,016	1
P 80%	60,5	10,81	0,179	11,00
Dialisado	4,472	0,1118	0,025	0,37
Fração 1	0,240	0,165	0,687	43,00

O fator de purificação da fração 1 foi muito alto, o que comprova uma boa purificação com relação a outros estudos recentes. Por exemplo, PAYROL *et al.* (2008) relatou ter obtido uma purificação de 1,45 vezes na *Bromelia pinguin* parcialmente purificada. Enquanto isso, o presente estudo mostrou uma purificação de aproximadamente 43 vezes.

Embora o fator de purificação seja considerado bom, pois outro autor obteve valor menor que este (RABELO *et al.*, 2004), É perceptível que a CM Sephadex C-50 não foi muito efetiva na purificação da bromelina. Isso possivelmente aconteceu devido a bromelina não ter se ligado as resinas de cargas oposta, uma vez que seu maior pico de atividade enzimática foi na sua primeira fração antes da aplicação da solução de NaCl em tampão citrato a 20 mM e pH 3,6. Tampão esse indicado para o uso com resinas de trocas catiônicas e enzimas com o ponto isoelétrico maior que o pH do tampão. Vale lembrar que a bromelina do fruto é uma protease de massa molecular igual a 31 KDa com ponto isoelétrico 4,5 (MARTIN *et al.*, 1992).

A maior atividade enzimática da bromelina foi observada na fração 1 (0,055 U/mL), seguido pela fração 2 (0,015 U/mL). No perfil da eluição da cromatografia (Figura 12), é válido observar a presença de quantidade proteína total na fração 2 e que a bromelina foi eluída na fração 1-2. Não foi possível observar atividade enzimática nas demais frações. Isso deve ter acontecido, possivelmente, pela desnaturação das mesmas ou até mesmo pela interferência de inibidores.

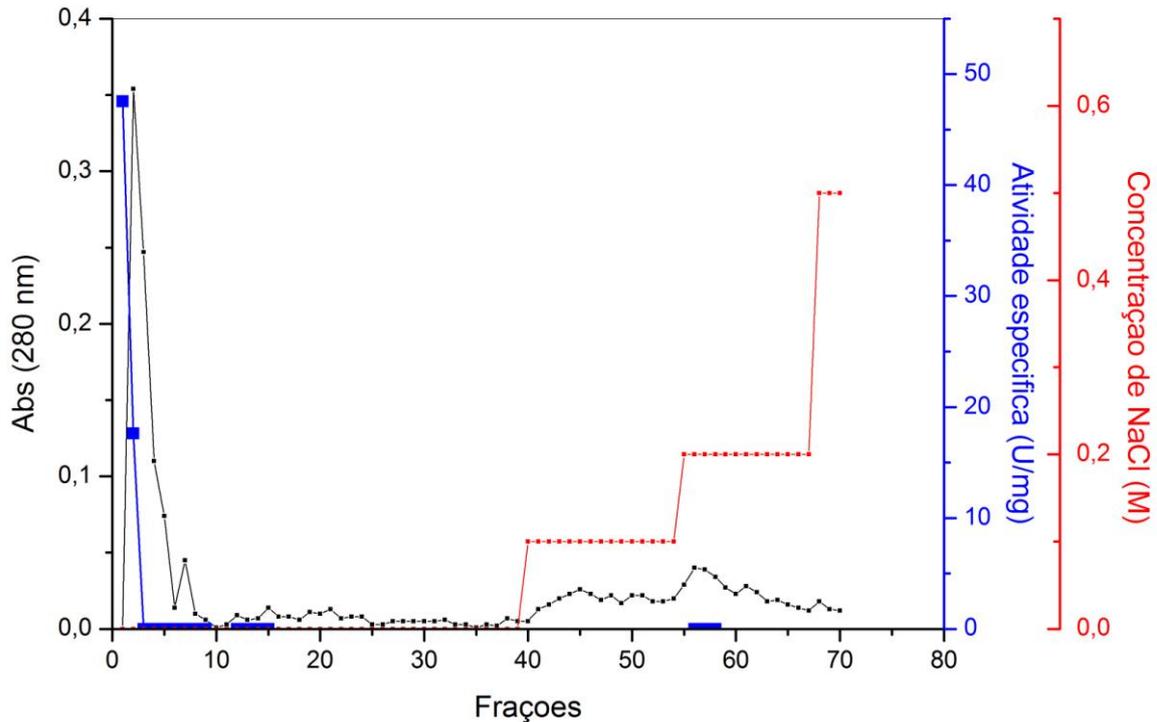


Figura 12 – Perfil cromatográfico da atividade específica e absorvância da bromelina em cromatografia de troca iônica CM Sephadex C-50.

Na Figura 12 observa-se o perfil cromatográfico da atividade específica da bromelina (U/mg) e a absorvância em 280 nm nas frações da cromatografia de troca iônica.

As frações obtidas foram eluídas com aplicação de uma solução salina de NaCl em diferentes concentrações, sendo elas: 0,1-0,5 M.

A fração 1 apresentou maior atividade específica quando comparada com as demais. Como relatado anteriormente, isso pode ter acontecido, provavelmente, pela interferência entre as resinas e a enzima. Os resultados apresentados são contrários a estudos feitos Kinugasa *et al.*(2003), este reporta que a presença de estrutura da água formando sal como NaCl realça a estabilidade das resinas, resultando em alto grau de extração.

Embora a cromatografia de troca iônica tenha apresentado alto fator de purificação na fração 1, é perceptível que a resina catiônica não foi eficiente como esperado para prosseguir com a caracterização da bromelina. Vale ressaltar que a única fração com atividade proteolítica, foi eluída antes de começar a eluição com NaCl em tampão citrato 20 mM e pH 3,6.

Sendo assim, diante desta limitação, foi testado outro protocolo para purificar a bromelina usando cromatografia de exclusão molecular (protocolo 3).

No protocolo 3, pode-se observar o acompanhamento da concentração de proteínas totais durante todo o processo de precipitação da enzima bromelina para poder verificar como esta ocorrendo a transferência da enzima do sobrenadante para o precipitado em função do tempo de operação e das condições operacionais, conforme mostra a Tabela 6. A atividade enzimática é a principal variável a ser avaliada, uma vez que, no caso de enzimas, não adianta ter elevadas eficiências de extração, se o produto obtido não tiver atividade, ou seja, se o produto perder sua função catalítica (MURACHI, 1976). Na, Tabela 6 pode se observa que a maior concentração de proteína foi obtida para o precipitado de F20-40%. Além disso, a maior quantidade de atividade foi observada no precipitado de F20-40% com relação aos demais precipitados, entretanto esta variável por si só não permite avaliar o grau de extração obtido. Para se ter um indicador do grau de extra-

ção, utiliza-se a atividade enzimática específica que consiste na razão entre a atividade enzimática e a concentração de proteína no final do processo.

Tabela 6 – Precipitação fracionada da bromelina com sulfato de amônio.

Etapa de purificação	Proteína total (mg/mL)	Atividade enzimática (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Purificação
Extrato bruto protéico	631,870	43,039	0,068	1
F0-20%	85,246	15,818	0,186	2,735
F20-40%	191,075	40,6	0,213	3,132
F40-60%	49,146	2,607	0,053	0,779
F60-80%	3,523	0,621	0,176	2,588
F80%	65,917	0	0	0

O valor do precipitado de F20-40% obtido para a atividade específica esta em consonância com a literatura, mostrando uma maior quantidade de atividade específica no mesmo intervalo de saturação com sulfato de amônio (DEVAKATE *et al.*, 2009). Isto mostra que mesmo não ocorrendo elevada transferência de proteína total, não significa que não houve a extração da proteína específica, neste presente estudo a bromelina.

O precipitado F60-80% obtido a partir da precipitação fracionada, apesar de obter menor valor no fator de purificação, foi usado para dar seguimento ao trabalho, uma vez que neste intervalo de precipitação as proteínas estavam mais concentradas.

Os resultados da atividade específica da precipitação fracionada com sulfato de amônio da Tabela 4 foram inferiores aos valores apresentados na Tabela 6, provavelmente decorrente das diferenças de cultivo e da maturação dos frutos, uma vez que os mesmos pertenciam à mesma cultivar Pérola. É válido lembrar que o estado de maturação influencia na atividade da bromelina (BORZANI *et al.*, 2001).

Na Tabela 7, observou-se o fator de purificação da enzima a partir da cromatografia de exclusão molecular. Além do mais, apresentou valores baixos de atividade específica, concordando com resultados apresentados por Harrach *et al.* (1998) que apresentou valores baixos de atividade específica (0,04 U/mg) para a fração 14.

Tabela 7 – Purificação da bromelina do fruto do abacaxizeiro (protocolo 3).

Etapa de purificação	Proteína total (mg)	Atividade enzimática (U)	Atividade específica (U/mg)	Purificação
Suco	631,870	43,039	0,068	1
P 80%	3,523	0,621	0,176	2,588
Fração 6-10	0,940	0,000100	0,000106	0,00156

O fator de purificação da fração mostrou-se baixo em relação ao extrato bruto protéico, mas isto é levado em consideração uma vez que as enzimas proteolíticas são as principais componentes presentes no extrato bruto protéico obtido a partir da polpa do fruto do abacaxi. Além do mais, há presença de inibidores no extrato bruto protéico, justi-

ficando assim, o maior valor obtido no fator de purificação. Contrário a estudos feitos por Bruno *et al.* (2008) que mostrou um fator de purificação de 1,1 para a fração 2.

Reddy *et al.* (1975) empregou a cromatografia de coluna com DEAE-Sephadex para o isolamento de sete frações de inibidores da bromelina do talo do abacaxi comercial, sendo a fração de número sete selecionada para análise de estrutura primária com base em seu alto rendimento. A análise composicional da fração sete de inibidor de bromelina estabeleceu que a mesma é composta de uma família de iso-inibidores, cada qual consiste de uma cadeia A (41 resíduos) ligada por uma ligação dissulfeto a uma cadeia B (10-11 resíduos).

A Figura 13, gráfico do perfil cromatográfico, apresenta os valores de atividade específica (U/mg) e das proteínas eluídas após cromatografia de exclusão molecular. A cromatografia de gel-filtração da bromelina nas frações entre as frações 7 e 10 resultou em um pico acentuado. A partir da fração 15 praticamente não se observou a presença de proteínas na absorbância monitorada a 280 nm, ou seja, os valores permaneceram-se constantes, sendo determinados até a fração de número 21.

As frações correspondentes ao primeiro pico de eluição, frações 6-10, foram combinadas para caracterização. No entanto, estas mesmas frações não apresentaram maior atividade específica da bromelina.

Após observar o perfil de atividade específica, as frações 19-21, também foram combinadas. No entanto, quando combinadas a atividade enzimática foi menor que a atividade das frações 6-10. Ao final do processo de purificação, a fração 6-10, obteve-se um baixo fator de purificação 0,00156.

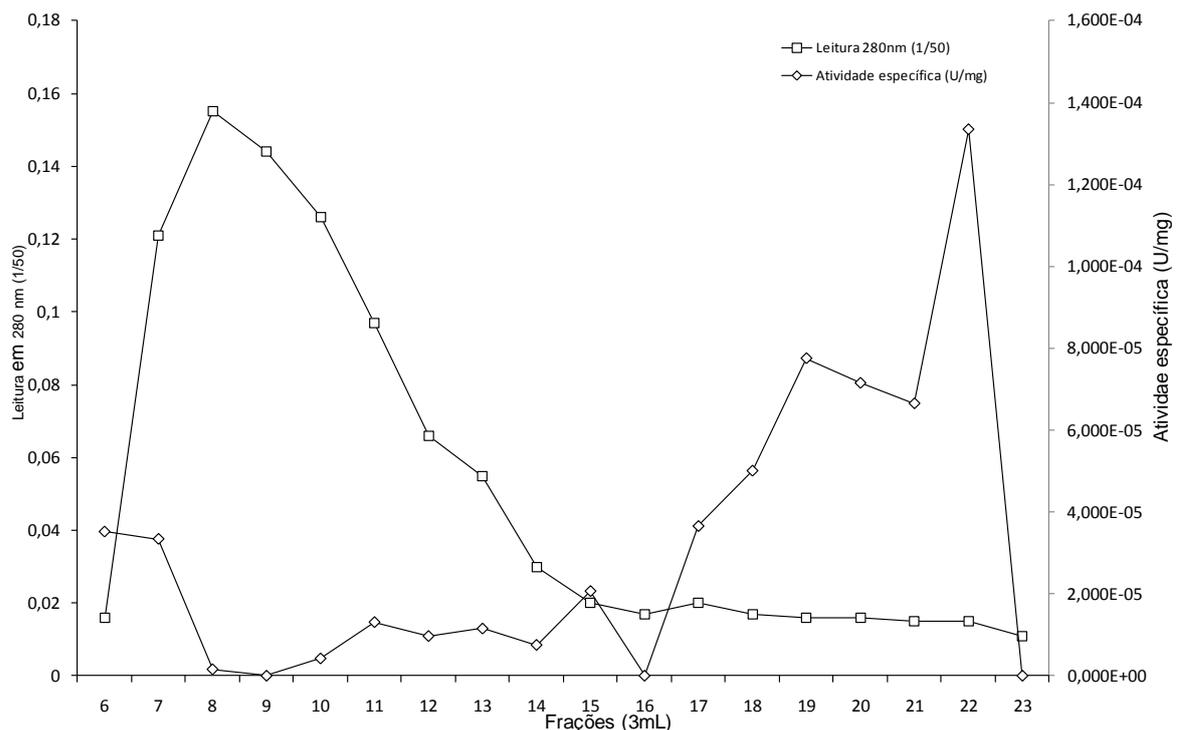


Figura 13 – Perfil cromatográfico da atividade enzimática da bromelina em cromatografia de gel-filtração Sephadex G-100.

As frações (6-10) com maior quantidade de proteína após cromatografia foram caracterizadas quanto aos parâmetros cinéticos (Figura 14).

Na Figura 14 encontra-se a curva de saturação do substrato caseína que foi utilizada para cálculo dos parâmetros cinéticos utilizando-se regressão não linear. O K_{mapp} obtido com o substrato caseína foi de 0,6910% e a V_{maxapp} de 1,913 $mmoles \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$. Em estudos da bromelina também do fruto da *Bromelia pinguin* L. Grown Payrol *et al.*

(2008) obteve K_m de 507 μM e V_{max} de 7,845 M s^{-1} para a fração purificada, enquanto que Harrach *et al.* (1998) apresentaram valores distintos do presente trabalho, onde o K_m para a fração da proteínase ácida da bromelina do talo na forma A (SBA/a) caracterizadas foi de 55,4 μM e 63,6 para a fração da proteínase ácida da bromelina do talo na forma B (SBA/b).

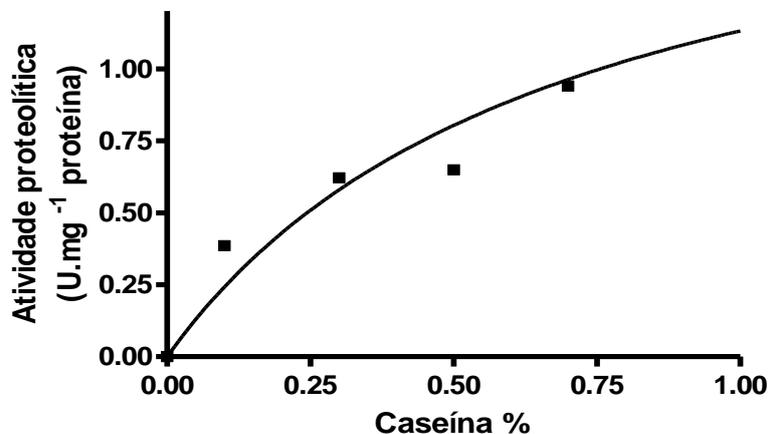


Figura 14 – Efeito da concentração de substrato na atividade proteolítica da bromelina cultivar Pérola, determinada nas frações obtidas (6-10) após cromatografia de gel filtração em coluna Sephadex G-100.

6 CONCLUSÃO

Os protocolos de purificação testados resultaram na purificação parcial da enzima bromelina do abacaxi.

O pH ótimo determinado para a bromelina presente no extrato protéico bruto e parcialmente purificada foi 5,0.

A temperatura ótima de ação determinada para a bromelina presente no extrato protéico bruto e parcialmente purificada foi 40 °C e 60 °C, respectivamente.

A eletroforese SDS-PAGE mostrou que a bromelina do *Ananas comosus* cultivar Pérola apresenta peso molecular próximo de aproximadamente 30 KDa.

A cromatografia de troca iônica, usando resinas catiônica CM Sephadex C-50, não mostrou-se eficaz para a técnica de purificação da enzima bromelina.

O protocolo 3 demonstrou que a precipitação de 80% por sulfato de amônio é a mais efetiva, obtendo assim, maior atividade específica no processo inicial de purificação da bromelina do abacaxi cultivar Pérola.

Os valores obtidos das constantes $K_{m_{app}}$ e $V_{max_{app}}$ foram 0,6190% e 1,913 $mmoles \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, P. J.; OBREGÓN, W. D.; TREJO, S. A.; CAFFINI, N. O. *Protein J* 27:88-96, 2007.
- ALLAIRE, M.; CHERNAIA M.M., MALCOLM, B.A.; JAMES, M.N. Picornaviral 3C cysteine proteinases have a fold similar to chymotrypsin-like serine proteinases. *Nature* 369: 72-76, 1994.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DA AGRICULTURA BRASILEIRA - AGRIANUAL 2006. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio/M & S Mendes & Scotoni, 2008.
- ASENJO, J.A.; Aqueous two-phase for: i. Systems, principles and manipulation of selectivity. ii. Processes and models. São Paulo, Apostila do Instituto de Pesquisas Tecnológicas, 1994.
- ASENJO, J. A. Separation processes in biotechnology. Ney York, Marcel, Dekker, 1990.
- AWANG, M. I.; RAZAK, O. A. Proteolytic activity of locally prepared pineapple bromelain. *Mardi Research Bulletin, Malásia*, v. 6, n. 2. p. 165-171, 1978.
- BAKER, E.N.; DRENTH, J. The thiol proteases: Structure and mechanism. *Biological Macromolecules and Assemblies*, Wiley, New York, USA. 3rd (ed.), p. 313-368, 1987.
- BARRETT, A. J.; RAWLING, N. D; WOESSNER, J. F. In: *Handbook of proteolytic enzymes*, 2nd edn. Academic Press, London, UK, p. 1051-1204, 2004.
- BELITZ, H., D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. *Food Chemistry*. 3 ed. Berlin: Springer-Verlag, 2004. 1070 p.
- BERTI, P.J.; STORER, A.C. Alignment/phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases. *J. Mol. Biol.* 246, 273-283, 1995.
- BIAZUS, J. P. M., SANTANA, J. C. C., SOUZA, R. R. De; TAMBOURGI, E. B. Caracterização da atividade amilásica do malte de milho (*Zea mays* L.). *Acta Sci. Technol.* v. 28, n.1, p. 13-19. 2006.
- BOND, J.S.; BUTLER, P.E. Intracellular Proteases. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 333-364, 1987.
- BORZANI, W. et al. *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. 1 ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, v. 2, 2001..
- BOTREL, N.; PATTO DE ABREU, C.M. Colheita, cuidados e fisiologia pós-colheita do abacaxi. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.17, n.179, p.33-40, 1994.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254, 1976.
- BRITO, C. A. K.; SATO, H. H.; SPIRONELLO, A.; SIQUEIRA, W. J. Abacaxi IAC Gomo-de-Mel (*Ananas comosus* (L.) Merrill): Característica da polpa e da peroxidase do suco. *B.CEPPA*, Curitiba, v. 25, n. 2, p. 257-266, jul./dez. 2007.
- BRUNO, M. A; TREJO, S. A.; AVILÉS, F. X.; CAFFINI, N. O.; LÓPES, L. M. I. *Protein J* 25: 224-231, 2006.
- BRUNO, M. A; TREJO, S. A.; CAFFINI, N. O.; LÓPES, L. M. I. Purificación and characterization of hieronymain III. Comparacion with other proteases previously isolated from *Bromelia hieronymi* MEZ. *Protein J.* 27, p. 426-433, 2008.
- CABRAL, J. R. S. Variedades. In: REINHARDT, D. H.; SOUZA, L. F. da S.; CABRAL, J. R. S. (Ed) *Abacaxi: produção, aspectos técnicos*. Frutas do Brasil, v. 7, p. 16-22, 2000.
- CABRAL, J.R.S.; FERREIRA, F.R. Preservação de recursos genéticos de abacaxi. *SIRGEALC – Simpósio de recursos genéticos para a América Latina e Caribe*, Londrina:IAPAR. p. 510 e 511, 2001.
- CABRAL, H.; LEOPOLDINO, A. M.; TAJARA, E. H. GREENE, L. J.; FAÇA, V. M.; MATEUS, R. P. CERON, C. R.; JUDICE, W. A. S.; JULIANOD, L.; BONILLA, R. G. O. *Protein Pept Lett* 13:83-89, 2006.

- CAMPOS, E. S. "Purificação e Caracterização de Bromelina a Partir do Extrato Bruto de *Ananas comosus* por Adsorção em Leito Expandido". Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química, Unicamp, Campinas, 2007, 49p.
- CARTER, C. E.; MARRIAGE, H.; GOODENOUGH, P. W. *BIOCHEMISTRY* 39: 11005-11013, 2000.
- CÉSAR, A. C. W. Otimização dos parâmetros de extração líquido-líquido em duas fases aquosas na recuperação da bromelina presente no abacaxi. Dissertação de Mestrado. Campinas, SP, Brasil, FEQ/UNICAMP, 2000.
- CHAPMAN, H.A.; RIESE, R.J.; SHI, G.P. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu. Rev. Physiol.* 59, 63-88, 1997.
- CHATSWORTH, O. S. 5441740 Cosmetic composition containing alpha hydroxyacids, salicylic acid, and enzyme mixture of bromelain and papain. *Biotechnology Advance*, 14 (4), patent abstract, 562, 1996.
- 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. 54th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture: Vitória/ES, 2008, 3p.
- DE-GIULI, M.; PIROTTA, F. Bromelain: interaction with some protease inhibitors and rabbit specific antiserum. *Drugs Exp Clin Res.* 4, 21-23, 1978.
- DEVAKATE, R. V.; PATIL, V. V.; WAJE, S. S.; THORAT, B. N. Purification and drying of bromelain. Separation and purification technology: 64, p. 259-264, 2009.
- DIAMOND, A. D., HSU, J.T. Aqueous two-phase systems for biomolecule separation. *Adv. Biochem. Eng.* 47: 89-135, 1992.
- FREIMAN, L. O.; SABAASRUR, A. U. Determinação de proteína total e escore de aminoácidos de bromelina extraídas dos resíduos do abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.19, n.2, 1999.
- GHARBAWI, M.; WHITAKER, J. R. Factor affecting enzymatic solubilization of beef proteins. *Journal of Food Science.* 28(1):168-172, 1963.
- HALE, L. P.; GREER, P. K.; TRINH C. T.; JAMES, C. L. Proteína activity and stability of natural bromelain preparations. *International Immunopharmacology*, 2, p.783-793, 2005.
- HALPERN, M. J. *Bioquímica*, 1ª edição, Lisboa-Portugal: editora Lidel, 1997.
- HARRACH, T; GARBIN, F.; MUNZIG, E.; ECKERT, K.; MAURER, H. R. bromelain: An immunomodulator with anticancer activity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2 (1/2), 164, 1994.
- HARRACH, T. ; ECKERT, K. ; SCHULZE-FORSTER, K. ; NUCK, R. ; GRUNOW, D. ; MAURER, H. R. Isolation and partial characterization of basic proteinases from stem bromelain. *J. Protein Chem.* 14, p. 41-52, 1995.
- HARRACH, T. ; ECKERT, K. ; MAURER, H. R. ; MACHLEIDT, I. ; MACHLEIDT, W. ; NUCK, R. Isolation and characterization of two forms of an acidic bromelain stem proteinases. *J. Protein Chemistry.* 17, p. 351-355, 1998.
- HERNÁNDEZ, M., CARVAJAL, C., SANTOS, R. et al. Nuevas posibilidades para la obtención de bromelina a partir cultivo de tecidos. In: ENCUENTRO LATINO AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 3, La Habanas. Anais... Cuba, 1998, V.1, p.486-487, 1998.
- INOUE, K.; et al. Effect of etodolac on prostaglandin E2 biosynthesis, active oxygen generation and bradykinin formation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 51, p. 457-462, 1994.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Produção Agrícola Municipal – Culturas Temporárias e Permanentes. Disponível em:<[HTTP://:IBGE.gov.br](http://IBGE.gov.br) > acesso em: 12 de maio de 2009.
- JUENG A. & FOSTER, S. *Encyclopedeia of Common Natural Ingredients Used in Foods, Drugs, and Cosmetics.* New York, NY: John Wiley & Sons. 688p.1980.

KHAN, R.H.; RASHEEDI, S.; HAQ, S.K.; J. BIOSCI. *Effect of pH, Temperature and alcohols on the stability of glycosylated and deglycosylated stem bromelain enzymes*, 28, 709-714, 2003.

KINUGASA, T.; KONDO, A.; MOURI, E.; ICHIKAWA, S.; NAKAGAWA, S.; NISHII, Y.; WATANABE, K.; TAKEUCHI, H. Effects of ion species in aqueous phase on protein extraction into reverse micellar solution. *Sep. Purif. Technol.* 31, 251-259, 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, p.137-142, 1990.

KUNITZ, M.; Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. *J. Gen. Physiol.*, 30:291, 1947.

LAEMMILI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, p.680-685, 1970.

LASKOWSKI, M. JR.; SEALOCK, R. W. In: *The Enzymes*. 3 ed, vol. 3, Academic Press, New York, p. 375-473, 1971.

LEE, K. L.; BERNASCONI, R. J.; EDMUNDS, T. Complete amino acid sequence of ananain and a comparison with stem bromelain and other plant cysteine proteases, *J. Biochem.* 327, p. 199-202, 1997.

LIVIO, M., et al. Effect of bromelain on fibrinogen level, prothrombin complex factors and platelet aggregation in the rat - A preliminary report. *Drugs Expt Clin Res.* 4, p.49-53, 1978.

LÓPES, L. M. I.; SEQUEIROS, C.; TREJO, S. A.; PARDO, M. F.; CAFFINI, N. O.; NATALUCCI, C. L. *Biol Chem Hoppe-Steyler* 382: 875-878, 2001.

LOPES, F. L. G., JUNIOR, J. B. S., SOUZA, R. R. de , EHRHARDT, D. D., SANTANA, J. C. C., TAMBOURGI, E. B. Concentration by Membrane Separation Processes of a Medicinal Product Obtained from Pineapple Pulp. *Jornal Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 52, n.2, p.457-464, 2009.

MARTINS, Z. J. de et al. Processamento: produtos e subprodutos, características e utilização. In: *Instituto de Tecnologia de Alimentos. Abacaxi, cultura, matéria prima, processamento e aspectos econômicos*. 2 ed., v.2, Série Frutas Tropicais, Campinas: ITAL, p.165-219, 1992.

MEINIG, G.E. Bromelain. *Phytomedicine*, v.2, p.1-2, 1999.

MERCIER, H., YOSHIDA, M. K. Bromelain activity in the leaf tissue of *Bromelia antiacantha*. *Journal of the bromeliad society*, V.48, n.1, p.6-10, 1998.

MORITA, A. H., UCHIDA, D. A., TAUSSIG, S. J. Chromatographic fractionation and characterization of the active platelet aggregation inhibitory factor from bromelain. *Arch Inter Phar Ther.* 239, p.340-350, 1979.

MURACHI, T. Bromelain enzyme. In: LORAND, L: *Methods in Enzymology*, v. XLV, p. 475-585, New York, Academic Press, 1976.

MURACHI, T.; YAMAZAKI, M. *Biochemistry*, 9: 1935-1938, 1970.

MURACHI, T.; NEURATH, H. Fractionation and Specificity Studies on Stem Bromelain. *The Journal of Biological chemistry*, v. 235, n. 1, p. 101-106, 1960.

NAPPER, A. D.; BENNETT, S. P.; BOROWSKI, M.; HOLDRIDGE, M. B.; LEONARD, M. J. C.; ROGERS, E. E.; DUAN, Y.; LAURSEN, R. A.; REINHOLD, B.; SHAMES, S. L. Purification and characterization of multiple forms of the pineapple-stem-derived cysteine proteinases ananain and comosain. *J. Biochem.* 301, p. 727-735, 1994.

OTA, S.; HORIE, K.; HAGINO, F.; HASHIMOTO, C.; DATE, H.; Fractionation and some properties of the proteolytically active components of bromelains in the stem and the fruit of the pineapple plant. *J. Biochem.*, v. 71, p.817-830, 1972.

PARDO, M. F.; LÓPES, L. M. I.; CAFFINI, N. O. NATALUCCI, C. L. *Biol Chem Hoppe Seyler* 382: 871-874, 2001.

- PARK, Y. K. Produção de enzimas Industriais de Origem vegetal. Biotecnologia Industrial, São Paulo, Ed. Edgard Blucher, V.3, 2001.
- PAYROL, J. A.; OBREGÓN, W. D.; TREJO, S. A.; CAFFINI, N. O. Purification and Characterization of Four New Cysteine Endopeptidases from fruits of *Bromelia penguin* L. Grown in Cuba. *J. Protein* 27: 88-96, 2008.
- PETER, H. W.; AHLERS, J. E MOREIRA, R. A. Cinética Enzimática. 1ª ed., Fortaleza – CE: EDUFC, p12-21, 1987.
- 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*. *REV. BRAS. PL. MED.*, Botucatu, V.5, n.1, p.68-73, 2002.
- POLGAR, L. Mechanisms of Protease Action. In Polgar L., (ed.). CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1989.
- PRICE, N., C.; STEVENS, L. Fundamentals of Enzymology. 3 ed. Bath: Oxford University, 1993. 486 p.
- RABELO, A. P. B. TAMBOURGI, E. B.; PESSOA, Jr. A. Bromelain partitioning in two-phase aqueous systems containing PEO–PPO–PEO block copolymers. *Journal of Chromatography B*, 807(1), p. 61-68. 2004.
- RASHEEDI, S.; HAQ, S.K.; KHAN, R.H., Guanidine hydrochloride denaturation of glycosylated and deglycosylated stem bromelain. *Biochemistry*, v. 68, p.1097-1100, 2003.
- REDDY, M. N.; KEIM, P. S., HEINRIKSON, R. L., KÉZDY, F. J. Primary Structural Analysis of Sulfhydryl Protease Inhibitors from Pineapple Stem. *The Journal of Biological chemistry*, v. 250, n. 5, p. 1741-1750, 1975.
- REGULY, J. C. Biotecnologia dos processos fermentativos. *Produção de enzimas –Engenharia das fermentações*, Vol.3, Pelotas-RS: EDUFPEl, 2000, 230p.
- REINHARD, D. H. R. C. CUNHA, G. A. P. Método de propagação. In: CUNHA, G. A. P.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, L. F. S. (Org.). *O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia*. Brasília, DF: EMBRAPA, p. 105-138, 1999.
- RICARDO, C. P. e TEIXEIRA, a. *Enzimas*. 4ª ed., Lisboa: Plátano editora S.A., 1993.
- ROWAN, A. D. BUTTLE, D. J.; BARRET, A. J. Ananain: A novel cysteine proteinase found in pineapple stem, *Arch. Biochem. Biophys.* 267, p. 262-270, 1988.
- ROWAN, A. D.; BUTTE, D. J.; BARRETT, A. J. The cysteine proteinases of the pineapple plant. *Biochemical Journal*, v.266, n.3, p.869-875, 1990.
- ROWAN, A. D. & BUTTLE, D. J. *Method Enzymol* 244: p. 555-568, 1994.
- RYAN, C. A. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. *Annual Review of plant physiology*. 24, 173-196, 1973.
- SAID e PIETRO, R., *Enzimas de interesse industrial e Biotecnológico*. 1ª ed., Rio de Janeiro: Eventos, 2002, 124p.
- SECOR, JR., E. R.; CARSON, W. F.; CLOUTIER, M. M.; GUERNSEY, L. A.; SCHRAMM, C.M.; WU, C.A.; THALL, R.S. Bromelain exerts anti-inflammatory effects in an ovalbumin-induced murine model of allergic airway disease. *Cellular Immunology*, 237 (1), p. 68-75, 2005.
- SHAW, E. Cysteine proteinases and their selective inactivation, p. 271-347. In A. Meister, Editor, *Advances in Enzymology*, Wiley, New York, USA, 1990.
- SILVA, R.A.; CADENA, P.G.; LIMA FILHO, J.L.; PIMENTEL, M.C.B. O fármaco bromelina: estudos físico-químicos e cinéticos. XLVI congresso brasileiro de química. Salvador, 2006.
- SILVERSTEIN, R.M. Identificação espectroscópica de compostos orgânicos. *Anal Biochem* 62: 478-484, 1974.
- SILVERSTEIN, R.M.; KEZDY, F.J. Characterization of the pineapple stem proteases (bromelain). *Arch. Biochem. Biophys.* 167, p.678-686, 1975.

SUH, H.J.; LEE, H.; CHO, H.Y.; YANG, H.C. Purification and characterization of bromelain isolated from pineapple. *Han'guk Nonghwa Hakhoechi*, v.35, p.300-307, 1992.

TAKAHASHI, N.; YASUDA, Y.; GOTO, K.; MIYAKE, T.; MURACHI, T. Multiple molecular forms of stem bromelain. Isolation and characterization of two closely related components, SB1 and SB2. *J. Biochem.*, v.74, p.355-373, 1973.

TAUSSIG, S. J. & NIEPER, H. A. Bromelain: its use in prevention and treatment of cardiovascular disease, present status. *J IAPM*. 6, p. 39-151. 1979.

TODAFRUTA. Recursos genéticos de abacaxi. Disponível em: <http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=10786> Acesso em : 15 de abril 2009.

UHLIG, G.; SEIFERT, J. The effect of proteolytic enzymes (traumanase) on posttraumatic edema. *Fortschr Med*. 99, 554-556, 1981.

VALLÉS, D.; FURTADO, S.; CANTERA, A. M. B. *Enzyme Microb Tech* 40: 409-413,2007.

VARENIKOVÁ, E., BETÁKOVÁ, T.; MUCHA, V.; SOLÁRIKOVÁ, KOSTOLANSKÝ, L.F.; WARIS, M.; RUSS, G. Preparation of monoclonal antibodies for the diagnosis of influenza A infection using different immunization protocols. *Journal of Immunological Methods*, **180** (1), 107-116, 1995.

VOGEL, R.; TRAUTSCHOLD, I.; WERLE, E. *Natural Proteinase Inhibitors*. Academic Press, New York, (1968).

WALTER, H.E. Proteinases: methods with hemoglobin, casein, and azocoll as substrates. p. 270-277 in: Bergmeyer, H.U. *Methods of Enzymatic Analysis*, Weinheim, Germany, Vol. 5, ed. Verlag Chemie. 1984.

WEN, S.; HUANG, T. H. W.; LI, G. Q.; YAMAHARA, J.; ROUFOGALIS, B. D.; LI, Y. Bromelain improves decrease in defecation in postoperative rats: Modulation of colonic gene expression of inducible nitric oxide synthase. *Life Sciences*, **78** (9), 995-1002, 2006.

WHARTON, C.W. The structure and mechanism of stem bromelain. Evaluation of the homogeneity of purified stem bromelain, determination of the molecular weight and kinetic analysis of the bromelain-catalysed hydrolysis of N-benzyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-serine methyl ester. *Biochem. J.*, v. 143, p. 575-586, 1974.

WHITE, R.R. et al. Bioavailability of 125I bromelain after oral administration to rats. *Biopharm Drug Dispos.* 9, P. 397-403. 1988.

WONG, D. W. S. *Food enzymes: structures and mechanism*. New York: Chapman & Hall, 1995. 390 p.

ANEXOS

6.1 PROCEDIMENTO ESQUEMÁTICO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Tubo T (Teste):

1. 2,5 mL de caseína 2%; pH 7,5; Tampão fosfato 0,1 M.
2. Repouso 37°C por 3 a 5 min
3. 0,2 mL de amostra
4. Misturar, deixar a 37°C por 10 min

5. 5 mL de TCA
6. Repouso 10 min, temperatura ambiente
7. Centrifugar a temperatura ambiente, 4000 g, 20 min
8. Ler absorbância do sobrenadante em 280 nm.

Tubo B₁ (Branco da amostra):

1. 2,5 mL de HCl 0,05 M
2. Repouso 37°C por 3 a 5 min
3. 0,2 mL de amostra
4. Misturar, deixar a 37°C por 10 min
5. 5 mL de TCA
6. Repouso 10 min, temperatura ambiente
7. Centrifugar a temperatura ambiente, 4000 g, 20 min
8. Ler absorbância do sobrenadante em 280 nm.

Tubo B₂ (Branco do aparelho):

1. 2,5 mL de HCl 0,05 M
2. Repouso 37°C por 3 a 5 min
3. 0,2 mL de HCl 0,05 M (em substituição à amostra)
4. Misturar, deixar a 37°C por 10 min
5. 5 mL de TCA
6. Repouso 10 min, temperatura ambiente
7. Centrifugar a temperatura ambiente, 4000 g, 20 min
8. Ler absorbância do sobrenadante em 280 nm

Tubo B₃ (Branco do substrato):

1. 2,5 mL de caseína 2%; pH 7,5; Tampão fosfato 0,1 M.
2. Repouso 37°C por 3 a 5 min

3. 0,2 mL de HCl 0,05 M (em substituição à amostra)
4. Misturar, deixar a 37°C por 10 min
5. 5 mL de TCA
6. Repouso 10 min, temperatura ambiente
7. Centrifugar a temperatura ambiente, 4000 g, 20 min
8. Ler absorbância do sobrenadante em 280 nm

6.2 PREPARO DOS PADRÕES DE TIROSINA

Solução Estoque (S_0): 5 mM

P_0 : 3 mL S_0 + 2 mL de água = 3 mM de tirosina

P_1 : 2 mL S_0 + 3 mL de água = 2 mM de tirosina

P_2 : 1 mL S_0 + 4 mL de água = 1 mM de tirosina

P_3 : 2,5 mL P_2 + 2,5 mL de água = 0,5 mM de tirosina

P_4 : 2,5 mL P_3 + 2,5 mL de água = 0,25 mM de tirosina

Tubo P_0 :

1. 2,5 mL de tirosina 3 mM
2. Repouso 37°C por 3 a 5 min
3. 0,2 mL HCl 0,05 M
4. Misturar, deixar a 37°C por 10 min
5. 5 mL de TCA
6. Repouso 10 min, temperatura ambiente
7. Centrifugar a temperatura ambiente, 4000 g, 20 min
8. Ler a absorbância do sobrenadante em 280 nm.

Tubo P_1 :

1. 2,5 mL de tirosina 2 mM
2. Repouso 37°C por 3 a 5 min
3. 0,2 mL HCl 0,05 M
4. Misturar, deixar a 37°C por 10 min
5. 5 mL de TCA
6. Repouso 10 min, temperatura ambiente
7. Centrifugar a temperatura ambiente, 4000 g, 20 min
8. Ler a absorbância do sobrenadante em 280 nm.

Tubo P_2 :

1. 2,5 mL de tirosina 1 mM

2. Repouso 37°C por 3 a 5 min
3. 0,2 mL HCl 0,05 M
4. Misturar, deixar a 37°C por 10 min
5. 5 mL de TCA
6. Repouso 10 min, temperatura ambiente
7. Centrifugar a temperatura ambiente, 4000 g, 20 min
8. Ler a absorbância do sobrenadante em 280 nm.

Tubo P₃:

1. 2,5 mL de tirosina 0,5 mM
2. Repouso 37°C por 3 a 5 min
3. 0,2 mL HCl 0,05 M
4. Misturar, deixar a 37°C por 10 min
5. 5 mL de TCA
6. Repouso 10 min, temperatura ambiente
7. Centrifugar a temperatura ambiente, 4000 g, 20 min
8. Ler a absorbância do sobrenadante em 280 nm.

Tubo P₄:

1. 2,5 mL de tirosina 0,25 mM
2. Repouso 37°C por 3 a 5 min
3. 0,2 mL HCl 0,05 M
4. Misturar, deixar a 37°C por 10 min
5. 5 mL de TCA
6. Repouso 10 min, temperatura ambiente
7. Centrifugar a temperatura ambiente, 4000 g, 20 min
8. Ler a absorbância do sobrenadante em 280 nm.

F. Atividade das Proteases Neutras

- Absorbância da amostra T: A_T
- Absorbância do branco B₁: A_{B1}
- Absorbância do branco B₃: A_{B3}
- Através de $A_T - A_{B1} - A_{B3}$, encontra-se na curva de calibração, a concentração de tirosina, C_{tir} , produzida pela ação da protease presente em 0,2 mL de amostra em 10 min a 37°C.

Concentração de proteína total (mg.mL^{-1}), atividade da enzima (U.mL^{-1}) e atividade específica (U.mg^{-1}) da enzima bromelina da coluna de gel filtração sephadex G-100(protocolo 1).

Etapas de purificação	Proteína total (mg/mL)	Atividade enzimática (U/mL)	Atividade específica (U/mg)
Suco do abacaxi	3,296	10,05	3,05
Sobrenadante	0,092	0	0
Precipitação	32,708	2,357	0,072
Fração 1	1,29	31,778	24,634
Fração 2	9	0,578	0,065
Fração 3	10,68	54,311	5,085
Fração 4	8,93	24,556	2,75
Fração 5	9,65	0	0
Fração 6	8,38	0	0
Fração 7	7,15	0	0
Fração 8	4,17	0	0
Fração 9	5,3	0	0
Fração 10	5,06	29,033	5,738
Fração 11	4,45	23,256	5,226
Fração 12	3,52	0	0
Fração 13	3,3	0	0
Fração 14	2,96	0	0
Fração 15	2,96	0	0
Fração 16	2,41	0	0
Fração 17	3,2	0	0
Fração 18	2,57	0	0
Fração 19	2,66	0	0
Fração 20	2,38	0	0
Fração 21	2,46	0	0
Fração 34	2,35	0	0
Fração 35	2,613	0	0
Fração 36	2,863	0	0
Fração 37	3,025	5,183	1,714
Fração 38	3,113	2,295	0,737
Fração 39	2,088	0	0
Fração 40	2,738	0	0

Etapa de purificação	Proteína total (mg/mL)	Atividade enzimática (U/mL)	Atividade específica (U/mg)
Fração 41	1,2	0	0

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)