

UNIVERSIDADE DE UBERABA
CURSO DE FARMÁCIA

VINICIUS DE ASSUNÇÃO RODRIGUES

EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA ENZIMA BROMELINA

UBERABA

2021

VINICIUS DE ASSUNÇÃO RODRIGUES

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentando a Universidade de Uberaba
como dos requisitos para a conclusão do
Curso de Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Renato Bortocan

Prof. Dr. Renato Bortocan

UBERABA

2021

Dedico este trabalho aos meus professores pela ajuda e colaboração, para mim se torna um profissional com excelência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus pelas minhas conquistas.

Aos meus pais por está ao meu lado nos momentos difíceis.

Agradeço a minha esposa que me deu força para continuar o caminho.

Agradeço a todos os professores por me ensinar o caminho certo e nunca desistir, especialmente a Tatiana Reis pela oportunidade de trabalhar ao seu lado na iniciação científica.

Aos amigos que caminham ao meu lado quem vem caminhando comigo nessa jornada de aprendizagem e aos que foram morar ao lado de Deus obrigado por tudo.

A sorte não abona os incompetentes.

Vinicius de Assunção Rodrigues.

RESUMO

A bromelina é uma enzima proteolítica encontrada no fruto do abacaxizeiro, tanto no fruto, casca e coroa, quantidade de enzima encontrada no fruto dependente das estações do ano, tipos de solo e maturação do fruto. Sua utilização no meio econômico tanto no consumo e na indústria têxtil, alimentícia e farmacêutica com tratamento dos distúrbios digestivos, com grande viabilidade econômica, tendo uma extração e purificação com alto rendimento e baixo custo, com poucas etapas para obtenção da enzima bromelina. Foi utilizada a precipitação no etanol gelado entre 2 a 5° C a 80% em contato com amostra etanol age na parte hidrófoba da enzima sem alterar sua estrutura molecular e função proteolítica após foi centrifugado a 400 rpm por 20 minutos, e descartado sobre nadante e adicionado tampão fosfato 0,1 mol, como substrato para enzima gelatina sem sabor. Onde suas estruturas moleculares são ligadas por 3 cadeias de aminoácidos em espiral, com ligações fracas, a enzima bromelina tem a ação de que quebrar essa cadeia entre aminoácidos, mantendo a gelatina amolecida, e um indicativo da presença da enzima nas amostras. Com precipitação no etanol, e um reagente de baixo custo podendo ser reaproveitado com processo de destilação, preservando o meio ambiente. A leitura no espectrofotômetro pelo reagente biureto possibilitou a leitura das amostras, após a reação da bromelina com gelatina comprimento de onda 540nm.

Palavras-chave: Bromelina. Abacaxizeiro. Precipitação etanol.

ABSTRACT

Bromelain is a proteolytic enzyme found in pineapple fruit, both in the fruit, skin and crown, the amount of enzyme found in the fruit depending on the seasons, soil types and fruit maturation. Its use in the economic environment both in consumption and in the textile, food and pharmaceutical industry with the treatment of digestive disorders, with great economic feasibility, having an extraction and purification with high yield and low cost, with few steps to obtain the enzyme bromelain. Precipitation in cold ethanol between 2 to 5° C to 80% in contact with sample ethanol was used, acting on the hydrophobic part of the enzyme without changing its molecular structure and proteolytic function after being centrifuged at 400 rpm for 20 minutes, and discarded over swimmer and added 0.1 mol phosphate buffer, as substrate for unflavored gelatin enzyme. Where their molecular structures are linked by 3 loosely linked spiral amino acid chains, the enzyme bromelain has the action of breaking this chain between amino acids, keeping the gelatin soft, and an indication of the presence of the enzyme in the samples. With ethanol precipitation, and a low cost reagent that can be reused in a distillation process, preserving the environment. The reading on the spectrophotometer by the biuret reagent enabled the reading of the samples, after the reaction of bromelain with gelatin at wavelength 540nm.

Keywords: Bromelain. Pineapple tree. Ethanol precipitation.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1 – Amostras frutos.....	7
Figura 2 – Amostras após centrifugar.....	7
Figura 3 – Amostra após filtração em gazes ésteres.....	8
Figura 5 – Amostra de gelatina com extrato do abacaxi.....	10
Figura 6 – Amostra após adicionar reagente biureto.....	10

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Concentração de bromelina mg/ml	11
Tabela 2- Teores umidade.....	11

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
mL	Mililitros
nm	Nanometros
pH	Potencial hidrogeniônico
RPM	Rotações por minuto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	5
3 MATERIAIS E METODO	6
3.1 Materiais	6
3.2 Métodos	6
3.2.1 Isolamento do grupo de enzimas Bromelina	6
3.2.2 Métodos analíticos.....	8
4 RESULTADO E DISCUSÃO	10
5 CONCLUSÃO	12
6 REFERENCIAS	13

1 INTRODUÇÃO

A planta do abacaxizeiro que pertence à família das *Bromeliaceae* essa classe tende a possuir uma grande adaptação à ambiente, tem uma boa adaptação em ambiente quente, umidade elevada em condições áridas, climas tropicais e altitudes elevadas acima do nível do mar. Distribuem-se por ampla área geográfica, desde o centro dos Estados Unidos até as regiões do norte da Argentina e do Chile (VIEIRA, 2006).

A mais conhecida mundialmente é a *Smooth cayenne* dada sua qualidade e aceitação comercial sendo a mais cultivada. A parte mais utilizada são os frutos, os principais produtos são frutos em calda e o suco pasteurizados, os restantes dos frutos casca, coroa, folhas, talo e núcleo são direcionados a resíduo agrícola e não são bem aproveitados com desperdício econômico (LEITE, 2010)

A sua infrutescência do abacaxi é consumida in natura, sem precisar de preparos, também pode ser processada e feita sucos, calda e enlatado, pode atribuir grande valor comercial, na indústria uma das partes mais importantes são a polpa, essa parte utilizada após o processo são gerados resíduos. Apresenta uma mistura de casca, folha, coroa e haste, que possui uma quantidade razoável dos grupos de enzimas proteolíticas bromelina (VIEIRA, 2006).

A enzima bromelina é o nome dado ao conjunto de enzimas que possui atividade proteolítica presente nos vegetais das famílias *Bromeliaceae*, da qual o abacaxi é a referência em termo de quantidade de enzima presente. Onde pode ser encontrado tanto na haste, raiz, folha e infrutescência do vegetal. Comparados a demanda e necessidade do mercado sua produção se torna pequena gerando grande valor comercial (SANTOS et al, 2009).

As proteínas são de extrema importância para nosso sistema fisiológico de forma eficiente e seletiva, participando de diversas reações bioquímicas, onde são gerados metabólitos dessas reações, as proteínas catalizadoras permanecem inalteradas após as reações. Um dos fatores de extrema importância para indústrias farmacêuticas e alimentícia, na produção de produtos que envolve reações químicas, na maioria das vezes são utilizadas enzimas para acelerar esses processos reduzindo

custos, mas também para tratamento de patologias hoje em dia encontramos diversos fármacos a com ativos a base de enzimas (LEHNINGER, 2007).

Os processos bioquímicos são gerados a partir de proteínas que possui função catalizadoras poder apresentar superior aos catalisadores sintéticos e inorgânicos. Tem um grau elevado de especificidade a respeito ao substrato, tem uma capacidade de acelerar as reações químicas específicas e tem a capacidade de atuar condições suaves de temperatura e pH em soluções aquosas. De modo que as enzimas têm se convertido em ferramentas importantes, não apenas na medicina como também na indústria química, alimentícia e na agricultura (LEHNINGER, 2007).

A bromelina é uma das proteases mais utilizadas na indústria que se encontra presente nos vegetais da família *Bromeliaceae*. Sua utilização na indústria vai desde a farmacêutica, passando pela alimentícia e têxtil em diversos processos tais como: produção de queijos, o amaciamento de carnes, tratamento do couro, da lã e da seda, a clarificação de cervejas, bem como no tratamento de distúrbios digestivos, feridas e inflamações, preparo de colágeno hidrolisado, entre outros. (BORRACINI, 2006).

Um dos métodos de separação mais tradicionais para recuperação e purificação de biomoléculas é a precipitação de proteínas de meios aquosos. A precipitação é uma operação unitária muito comum amplamente utilizada na separação de proteínas. O método provoca alteração estrutural tridimensional na proteína levando a alteração da sua estrutura. Podendo ser muito agressivo, e podendo ser utilizado o ressolubilização são possíveis no precipitado. Os precipitados proteicos são agregados de moléculas grandes o suficiente para serem decantados ou centrifugados. É uma técnica de fácil ampliação de escala e com viabilidade para operação contínua a custos aceitáveis para grandes volumes. Porém, é uma técnica mais de concentração do que propriamente purificação. (SANTOS, 2006)

A solubilidade das proteínas depende da distribuição de grupos ionizáveis, hidrofóbicos e hidrofílicos na superfície da molécula. As características responsáveis por provoca as interações polares solvente aquoso, a interações iônicas são provocadas por sais presentes no meio, com a repulsão eletrostática com molécula de mesmas cargas. A presença de sais, solventes orgânicos e pH são fatores importantes na solubilidade das proteínas (SCOPES, 1994).

Ao adicionar solventes orgânicos exemplo miscíveis como acetona, metanol e etanol ao meio aquoso onde contém as proteínas podendo causar uns efeitos que provoca a precipitação das proteínas. O solvente promove a destruição das camadas de hidratação nos grupos hidrofóbicos e passa a circular nas regiões devido solubilidade e maior meio ao solvente. As regiões carregadas com a carga positiva ou negativa da superfície da proteína passam a interagir, devido à retenção de água pelo solvente orgânico, atraindo-se umas às outras e formando agregados. As interações do solvente com as zonas hidrófobas internas causam desconformação irreversível da proteína. Podendo ser minimizados com a redução da temperatura onde pode levar valor da ordem zero ou abaixo, com a temperatura baixas faz flexibilidade da molécula e reduzindo a capacidade da penetração do solvente e a desnaturação das proteínas. Os álcoois de cadeia mais longa apresentam maior. Desnaturaste do que os de cadeia mais curta (SCOPES,1994).

Com a carga global aproximada de zero na proteína na sua superfície, causa no seu ponto isoelétrico, pode ser minimizado a repulsão eletrostática que causa a precipitação por meio interações entre as zonas hidrofóbicas. Esse processo chama-se precipitação isoelétrica, sendo realizado apenas com a correção do pH. Em geral a precipitação por método qualquer pode ser facilitada no ponto isoelétrico. A adição de sais neutros, principalmente $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a elevadas concentrações (1,5 a 3,0 M) reduz a disponibilidade da água devido a hidratação dos íons, criando condições para precipitação, a qual ocorre principalmente por interação das zonas hidrófobas. O sal e outros precipitantes no meio não provocam a precipitação de todas as proteínas do meio, pois o efeito é o de reduzir a solubilidade. A concentração de solvente ou sal podem provocar a precipitação pode variar com concentração da proteína e a presença de contaminantes. Este fato pode ser aproveitado se existir a intenção de realizar-se um fracionamento. (SANTOS, 2006).

A precipitação das proteínas em etanol 80% v/v, com a temperatura a 5°C em pH onde sem encontra amostra original e uma das formas mais adequada para ser ter uma boa recuperação da bromelina que está presente no fruto do abacaxi, gera um rendimento de 100%. Uma das grandes vantagens da utilização do solvente etanol com uma agente precipitação pode ser obtida com baixo custo e abundância, se tornando interessante economicamente. Podendo ser reaproveitado em processo destilação, assim reduz impactos ambientais pela liberação no meio ambiente, como

e causo quando a utilizado o sulfato de amônia. As desvantagens do uso do etanol são: necessidade de operação a baixa temperatura para minimizar a desnaturação da enzima e o perigo de inflamabilidade deste solvente (CÉSAR1999).

A determinação qualitativa das proteínas, com uma variedade de reagentes que reagi que resulta em produtos coloridos. Certos grupos funcionais tende a ter reações específicas ou sejam comuns nas proteínas. Destaca-se a reação de Biureto com a característica com a formação de complexo de ligação peptídicas com íon metálico cúprico Cu^{2+} , sendo encontrado no reagente de Biureto, dando uma utilização para determinar concentrações de proteínas. As reação de Biureto que tem características pela formação do complexo de ligações peptídicas e o íon metálico cúprico, Cu^{2+} , que se encontra no reagente de Biureto, sendo este um método usado para a determinação de concentrações de proteínas totais em meios distintos, como os alimentos, soro sanguíneo e urina (BRITO E FREITAS 2018).

2 OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo o processo de extração enzimas proteolíticas, presente no fruto (*Ananas comosus* L. Merrill) por métodos de solventes orgânicos com etanol a 80% e quantificação.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Na realização dos testes foram utilizados: Béquer 500ml, béquer 1000ml, béquer 250, proveta 25ml, proveta 500ml, tubos de ensaio, balão 1000ml, balão 50ml, funil, bureta 50ml, tamisa malha 20mm,alcoômetro, pipeta volumétrica 10ml, pipeta volumétrica 5ml, erlenmeyer 250ml.

Equipamentos Utilizados: Centrifuga excelsa baby 1 marca fanem, triturador industrial marca metvisa, modelo Iro3 3,5ml, estufa marca olidef modelo cz, espectrofotômetro (FEMTO - Modelo 482) e cubeta, balança analítica gehaka - modelo AG-200, banho maria nova Instruments, modelo NI 1229.

Reagentes utilizados: Etanol do fabricante rioquimica, reagente biureto fabricante bioanalitica, gelatina sem sabor fabricante royal, tampão fosfato fabricante nuclear.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Isolamento do grupo da enzima bromelina

Utiliza como principal matéria-prima frutos verdes e maduros de *Ananas comosus* L. Merrill (abacaxi) coletados no centro de comercialização de frutas na Av. Reinaldo Guareto em Uberaba nº 450 em 15 novembro 2021.

As amostras foram levadas para laboratório da universidade de Uberaba, lavadas para retiradas de impureza, logo após foram separadas retirando casca e coroas foram descartadas, sobrando apenas o núcleo central do fruto, foram fatiados, foi utilizado um liquidificador industrial da marca (METVISA) para reduzir tamanho das partículas. Para melhor homogeneidade fora processada no processador de alimentos marca (IKA MODELO A 11B).



Figura 1: Frutos (amostras)
Fonte: Do Autor



Figura 2: Amostra após centrifugação
Fonte: Do Autor

O material precipitado na etapa de centrifugação foi separado por filtração com gazes estéreis. O sobrenadante foi armazenado em frascos estéreis e identificado como extrato bruto, armazenado em freezer à 0 ° C (Figura 3).



Figura 3: Amostra após filtração em gazes ésteres
Fonte: Do Autor

Precipitação com etanol

Foram preparados solução de etanol a 80%, com uma proveta volumétrica de 500ml e com auxílio alcoômetro, após preparado foi armazenado em um béquer 500ml, em um freezer a temperatura 0 °C, por uma hora.

Após uma 1 hora em banho gelado, com auxílio de uma proveta volumétrica 50ml foi adicionado, lentamente 40 ml etanol gelado gotejando lentamente por 15 minutos, tempo necessário para o etanol desestabiliza a camada hidrófoba da enzima, após centrifuga por 20 minutos a 3000 Rpm, descartar sobre nadante, adicionar 2 ml solução tampão fosfato a 0,1 mol em pH 7, após passada em um agitador vortex.

3.2.2 Métodos analíticos

A) Teste da gelatina

Preparou-se uma solução de gelatina em béquer solubilizando-se 12 gramas de gelatina sem sabor em 300ml solução tampão. Aguardou-se a solubilização completa da gelatina em banho maria a 37° C por 5 minutos. Adicionou-se 2 ml da amostra após extração e 5 ml suspensão de gelatina em três tubos separados, levou-se os tubos para geladeira. Após 15 minutos, observou-se a gelificação.

B) Método do Biureto

Pesou-se 1g de gelatina sem sabor, hidratada em água destilada em banho maria a 37° C até a solubilização total.

Preparou-se 4 tubos de ensaio: branco, padrão, amostra A e amostra B. Foram adicionados ao tudo A 1ml de extrato bruto mais 5ml gelatina, tudo B 1ml de extrato bruto mais 5ml gelatina, tudo padrão 1ml água destilada mais 5ml gelatina e tubo branco 1ml água.

Após 10 minutos em banho maria, centrifugou-se a 400 rpm por 3 minutos em seguida adicionou-se 1ml do reagente de biureto e aguardou-se 10 minutos para reação. Na sequência mediu-se a absorbância em 540 nm.

B) Determinação de umidade

Colocou-se dois béqueres na estufa a 115°C por 15 minutos para retirar toda umidade da vidraria, após foram condicionados em dessecador até resfriamento.

Pesou-se os béquers vazios em uma balança analítica. Em seguida transferiu-se 5g de cada amostra do abacaxi para cada béquer e pesou-se novamente. Os béquers foram colocados na estufa a 105° C por 2 horas. Depois deste tempo os béquers foram resfriados em dessecador e pesados novamente. O procedimento foi repetido até peso constante.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A) Teste da gelatina

Após os 15 minutos de resfriamento, observou-se que não houve formação de gel nos tubos 1 e 2, apenas tubo número 3 onde não continha amostra apenas gelatina hidratada no tampão fosfato (Figura 4).

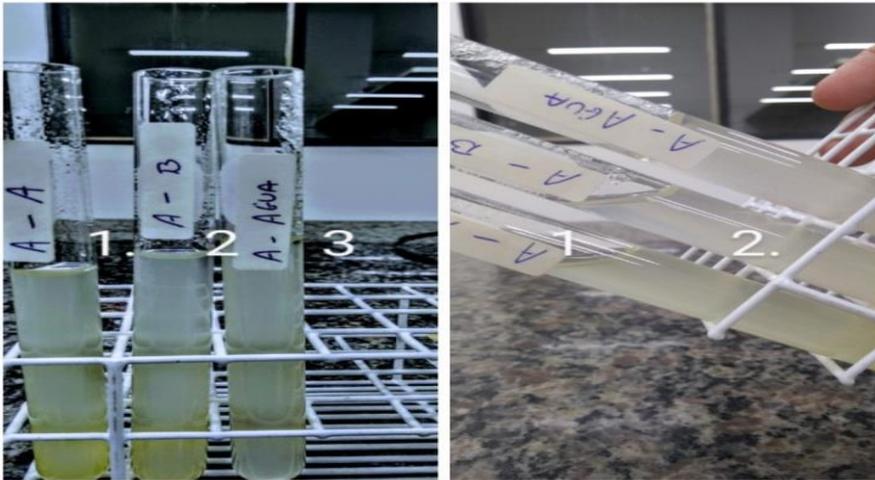


Figura 4: Amostra de gelatina com extrato do abacaxi

Fonte: Do Autor

B) Método do Biureto

Após a adição dos componentes do teste aos tubos, pode-se observar a coloração violeta do padrão indicando presença de proteína (Figura 5). O Teste do Biureto é um teste geral para proteínas e peptídeos com mais de dois aminoácidos. A reação do Biureto é o resultado da formação de um complexo entre Cu^{2+} e as proteínas ou peptídeos com mais de dois aminoácidos (CAPONI, 2016).

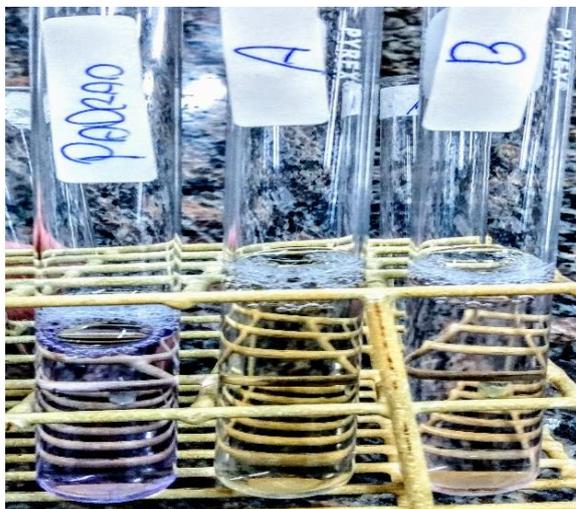


Figura 5: Amostra após adicionar reagente biureto

Fonte: Do Autor

Para determinar a concentração das amostras A e B, utilizou a lei de Beer-Lambert, $A = \varepsilon \cdot C \cdot d$.

AMOSTRA	PROTEINA BROMELINA
FRUTO MADURO	0,43 mg/ml
FRUTO VERDE	0,41mg/ml

Tabela:1 Concentração de bromelina mg/ml

Fonte: Do Autor

Amostra fruto maduro apresenta quantidade de enzima maior em relação ao fruto verde, podendo variar pelo clima, temperatura, pH e tipos de solo. Podendo apresentar uma concentração maior quando purificada, apresentado uma recuperação de 3 a 5 vezes, demonstrando um aumento significativo na atividade, e consequentemente uma quantidade maior de enzimas (CAPONI, 2016).

C) Teor de umidade

Após a pesagem dos béquers ao final do teste, procedeu-se ao cálculo da porcentagem de umidade empregando-se a diferença dos pesos dos béquers antes e após o teste. Os resultados são apresentados na tabela 2.

AMOSTRA NUCLEO	TEOR UMIDADE %
Fruto maduro	92,78%
Fruto verde	92,37%

Tabela: 2 Teores umidade

Fonte: Do Autor

Observa-se que há grande quantidade de água nas amostras analisadas o que era esperado uma vez que o material em questão foi preparado empregando-se este solvente.

5 CONCLUSÃO

Tendo em vista os aspectos observados no teste de gelificação da bromelina em frutos maduro e verde comprova-se que o método de extração é eficiente para a obtenção da enzima. Em relação a concentração da enzima nos frutos maduro e verde constata-se que apresentam valores próximos.

REFERÊNCIAS

ANTUNES, Rafael Souza et al. **Enzimas vegetais: extração e aplicações biotecnológicas**. Infarma Ciência Farmacêuticas, Anápolis, v. 3, n. 29, p. 181-198, 28 abr. 2017.

BRITO, Cássia Almeida; FREITAS, Leonardo Viana de. **CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS VIA MÉTODO DE BIURETO COMO PROPOSTA INTERDISCIPLINAR PARA O ENSINO DE QUÍMICA DE COORDENAÇÃO**. Experiências em Ensino de Ciências, Rio de Janeiro, v. 13, n. 5, p. 1-31, 13 maio 2018. Anual. Disponível em: https://if.ufmt.br/eenci/artigos/Artigo_ID524/v13_n5_a2018.pdf. Acesso em: 29 nov. 2021

CAPONI, Luiz Henrique. **APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DE ABACAXIZEIRO PARA EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BROMELINA**: aproveitamento de resíduos de abacaxizeiro para extração e purificação de bromelina. 2016. 31 f. TCC (Graduação) - Curso de Tecnologia em Processos Químicos, Diretoria de Graduação e Educação Profissional Coordenação do Curso de Tecnologia em Processos Químicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, 2016. Cap. 15.

CESAR, Ana Claudia Wabiszczewicz. **Otimização dos parâmetros de Extração Líquido- Líquido em Duas Fases Aquosas na Recuperação da Bromelina Presente no Abacaxi**. 2000. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Sistemas de de Processos Químicos e Informática, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - São Paulo, 2000.

CESAR, Ana Claudia Wabiszczewicz. **Análise de Viabilidade Econômica de um Processo de Extração e Purificação da Bromelina do Abacaxi**. 2005. 99 f. Tese (Doutorado) - Curso de Faculdade de Engenharia Química, Área de Concentração, Universidade Estadual de Campinas, Capinas, 2006. Cap. 99.

COÊLHO, Diego de Freitas. **Purificação de Bromelina dos Resíduos de Abacaxi (Ananas comosus L. Merrill) por Precipitação integrada a Sistema Bifásico Aquoso (PEG/Sulfato de Amônio) não Convencional**. 2012. 113 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Sistemas de de Processos Químicos e Informática, Universidade Estadual de Campinas, Capinas, 2012. Cap. 57.

FERREIRA, Juliana Ferrari et al. **Extração e caracterização de uma enzima proteolítica do curauá (Ananas Erectifolius)**. Exacta, São Paulo, V. 8, N. 2, P. 179-184, 2010., São Paulo, v. 2, n. 8, p. 179-184, 28 jun. 2010.

SANTOS, Regina Lúcia de Andrade dos. **ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: SISTEMAS DE PROCESSOS QUÍMICOS E INFORMÁTICA LABORATÓRIO DE CONTROLE E AUTOMAÇÃO DE PROCESSOS (LCAP)**: controle e monitoramento, em tempo real, de um processo de precipitação de bromelina utilizando comunicação digital fieldbus. 2006. 111 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Engenharia de Sistemas Químicos - Feq- Unicamp, Universidade Estadual de Campinas, Campinas SãoPaulo, 2006. Cap.5. Disponível em: http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/266163/1/Santos_ReginaLuciadeAndradedos_M.pdf. Acesso em: 28 set. 2021.