



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA**

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

HELBER BARCELLOS DA COSTA

Desenvolvimento de processo para a purificação de
bromelina a partir de resíduos de abacaxizeiro (*Ananas
comosus* var. *comosus*) cv. Vitória



RENORBIO

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

HELBER BARCELLOS DA COSTA

Desenvolvimento de processo para a purificação de bromelina a partir de resíduos de abacaxizeiro (*Ananas comosus* var. *comosus*) cv. Vitória

Vitória- ES
2014

HELBER BARCELLOS DA COSTA

Desenvolvimento de processo para a purificação de bromelina a partir de resíduos de abacaxizeiro (*Ananas comosus* var. *comosus*) cv. Vitória

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia (RENORBIO) e Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) sob orientação do Prof. Dr. José Aires Ventura como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor.

Vitória- ES
2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

C837d Costa, Helber Barcellos da, 1984-
Desenvolvimento de processo para a purificação de bromelina a partir de resíduos de abacaxizeiro (*Ananas comosus* var. *comosus*) cv. Vitória/ Helber Barcellos da Costa. – 2014. 150 f. : il.

Orientador: José Aires Ventura.
Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Enzimas proteolíticas. 2. Bromelina. 3. Purificação. I. Ventura, José Aires, 1954-. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Ponto Espírito Santo - Universidade Federal do Espírito Santo

DEFESA DE TESE

ALUNO: HELBER BARCELLOS DA COSTA

TÍTULO DO PROJETO: "Desenvolvimento de Processo para a Purificação de Bromelina a partir de Resíduos de Abacaxizeiro (*Ananas comosus* var. *comosus*) cv. Vitória"

PROFESSOR ORIENTADOR: José Aires Ventura

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. José Aires Ventura
RENORBIO/UFES (Orientador)

CONCEITO

ASSINATURA

SUFICIENTE

SUFICIENTE

SUFICIENTE

SUFICIENTE

SUFICIENTE

Prof. Dr. Wanderson Romão
IFES (Titular)

Prof. Dr. Hildegardo Seibert França
IFES (Titular)

Prof. Dr. Ricardo Machado Kuster
UFRJ (Titular)

Prof. Dr. Hélcio Costa
INCAPER (Titular)

TIPO DE SESSÃO: Aberta

DIA: 20 de Fevereiro de 2014

HORÁRIO: 14:00 horas

LOCAL: Universidade Federal do Espírito Santo – Núcleo de Biotecnologia, 2º andar, sala 04.

Dedico este trabalho à minha família, pelo apoio, incentivo e força ao longo desse caminho trilhado.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por suas delicadezas me fazerem acreditar que esse sonho era possível

Aos meus pais, Carlinhos e Ada porque sem eles, nada disso seria possível.

Aos meus irmãos, Elaine e Alberto pela amizade e apoio incondicional aos meus estudos.

Ao Prof. Dr. José Aires Ventura, por sempre acreditar em mim, pela sabedoria, pelo apoio. Por tornar real um sonho de um menino.

A Profa. Dra. Patricia Fernandes, por me aceitar no Núcleo de Biotecnologia, pelo exemplo de profissionalismo, seriedade, competência e apoio.

Ao Prof. Dr. Antonio Alberto Fernandes, por todo apoio e palavras sábias.

Aos Professores da banca, Dr. Hélcio Costa, Dr. Hildegardo Franca, Dr. Ricardo Kuster e Dr. Wanderson Romão pela valiosa contribuição ao nosso trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio pelo espírito de família conquistado. Em especial, Lorena Carnielli, Tássia Nati e Jeferson pela amizade.

Ao Núcleo de Competências em Química do Petróleo que na pessoa do professor Dr. Eustáquio Vinicius Castro que me recebeu no último ano de doutorado.

A Professor Dr. Wanderson Romão, por ter me recebido no Laboratório de Petroleômica e Forense, pela competência. Por sua essência de pesquisador ter recuperado em mim o amor pela pesquisa. Pela amizade, conselhos, estímulos e orientações.

Aos colegas do Laboratório de Petroleômica e Forense que tornaram o último ano menos sofrido, pela amizade e pelo acolhimento. Em especial a Gabriela e Lindamara.

Ao Silas, pelo profissionalismo e disponibilidade na análise e acompanhamento dos dados de espectrometria.

Ao Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ (IBqM) , e ao Laboratório de Hemostase e Venenos do IBqM por ceder gentilmente o MALDI-TOF-TOF.

Aos melhores amigos que eu podia ter, Carol, Cristina, Claudinha, Fernando, Jamilli, Marina, Natália, Renata, Roberta e Túlio. Por respeitarem e entenderem minhas ausências, por fazerem das minhas horas livres os melhores momentos da minha vida.

Ao casal Emílio e Thaiz Miguel, pela amizade, carinho e respeito.

A Hilda Aragão, pela amizade, por me proporcionar uma viagem sem fim, dentro de mim mesmo e com isso permitir a conclusão desse trabalho.

Aos amigos Adriana Korres, Gloria Viegas, Jessica Martins, Mauricio Mattar e Michelli Santos por todo apoio, amizade e carinho.

A CAPES e a FAPES, pela concessão da bolsa de doutorado. Às agências de fomento FINEP, CAPES, CNPq, Banco do Nordeste, FAPES pelo incentivo à pesquisa.

Por fim, a todos aqueles que em apenas por olhares apostaram em mim.

“Cantar, a beleza de ser um eterno aprendiz...!”
Gonzaguinha

RESUMO

COSTA, H. B. Desenvolvimento de processo para produção de bromelina a partir de resíduos de abacaxizeiro (*Ananas comosus* var. *comosus*) cv. Vitória. 2014. 154 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo, Brasil. Orientador: Prof. Dr. José Aires Ventura.

Atualmente existe uma crescente demanda pelo uso de enzimas com aplicação industrial e terapêutica. Dentre a vasta aplicabilidade das enzimas merecem destaque as proteases que representam 60 % do total das enzimas utilizadas no mundo. A bromelina é uma protease com relevância na indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica e biotecnológica, de alto valor comercial, que pode ser obtida a partir de resíduos do abacaxizeiro. O Brasil está entre os primeiros produtores mundiais de abacaxi, sendo que os resíduos agrícolas e agroindustriais não tem destino, podendo ser utilizado como fonte de obtenção de bromelina. Este trabalho objetiva desenvolver uma nova metodologia de purificação de bromelina a partir de resíduos do abacaxizeiro cv. Vitória. O trabalho está dividido em quatro capítulos. 1: As características físico químicas (Sólidos solúveis totais (SST), acidez titulável (AT) e a razão SST/AT), protéicas e de atividade de bromelina entre os frutos das cvs. Vitória e Pérola em diferentes estádios de maturação foram comparadas. A cv. Vitória (resistente à fusariose) apresenta características semelhantes ou superiores à cv. Pérola, o que contribui para sua aceitação pelo mercado consumidor e a consequente ampliação do seu cultivo, tornando viável a utilização de seus resíduos como fonte de obtenção de bromelina; 2: A comparação entre cinco diferentes soluções de extração de bromelina (H_2SO_4/Na_2SO_4 pH 4,5; tampões acetato pH 3,6; 4,0 e 5,0 e tampão fosfato pH 7) e entre dois métodos de precipitação fracionada (acetona gelada e sulfato de amônio) e diferentes cromatografias de troca iônica (DEAE-celulose, SP-Sepharose e CM-Celulose). A solução de extração H_2SO_4/Na_2SO_4 pH 4,5 apresentou o maior rendimento de proteínas totais e atividade proteolítica e atividade específica. Na precipitação fracionada, as frações 20-50 % (F2S) e 50-75 % (F3S) de saturação por sulfato de amônio renderam maiores valores de atividade proteolítica com 88,57 % e 98,42 % respectivamente, quando comparadas à precipitação por acetona gelada. Durante a purificação, a fração F3S foi aplicada em diferentes resinas de troca iônica e observou-se que a CMC manteve os valores de atividade proteolítica mais elevados (89,31%); 3: Uma nova metodologia de purificação foi desenvolvida utilizando CMC e Sephadex® G-50, obtendo uma bromelina pré purificada (FP 3,01 – 93% de atividade) e bromelina purificada (FP 16,86 – 89% de atividade). A pureza da bromelina foi confirmada por SDS-PAGE revelando apenas uma banda em 30 kDa, por HPLC com apenas um pico nos primeiros 10 minutos e, por espectrometria de massas (MALDI-TOF MS) através do *Peptide mass fingerprint* (PMF) da enzima. Além da fragmentação (MALDI-TOF MS/MS) e sequenciamento de dois peptídeos m/z 951 e 1584; 4: Foi realizado uma caracterização cinética da bromelina pré-purificada e purificada. A bromelina pré-purificada apresenta duas temperaturas ótimas (40 e 60°C) e um pH ótimo (8) e que a bromelina purificada apresenta temperatura ótima de 60 °C e pH ótimo de 8. Por fim, é possível afirmar que os resíduos de abacaxi da cv. Vitória foram uma boa fonte de obtenção de bromelina. A metodologia desenvolvida foi inovadora e possibilitou obter bromelina com alto grau de pureza e maior viabilidade de execução por reduzir os passos de sua purificação comparada com as metodologias existentes.

Palavras-chave: Enzimas proteolíticas, bromelina, purificação

ABSTRACT

COSTA, H. B. Process development for bromelain production from pineapple waste. (*Ananas comosus* var. *comosus*) cv. Vitória. 2013. 157 f. Thesis (Doctoral in Biotechnology) - Post Graduation Program in Biotechnology, UFES, Espírito Santo, Brazil. Adviser: Prof. Dr. José Aires Ventura.

Presently there exists an increasing demand for the enzymes used in industrial and therapeutic applications. Within the wide range of applications for enzymes, the proteases are outstanding, since their use represents 60% of the volume of enzyme use worldwide. Bromelain is a protease having high commercial value of interest for the food, cosmetic, pharmaceutical and biotechnical industries, which can be obtained from pineapple's waste. Brazil is the most producers of pineapple in the world however the residues of the pineapple resulting from activities in agriculture and agro industry find no useful destination and so, could be used as a source of bromelain. The aim of this work was to develop a new methodology for the purification of bromelain from residues of the pineapple plant, cv. Vitoria. This work was divided into four chapters. 1: A comparison of the physicochemical (total soluble solids (TSS); titratable acidity (TA) and TSS/TA ratio), protein and enzymatic of the fruit of cvs. Vitoria and Pérola was realized. The cv. Vitória (resistant to fusariosis) presented characteristics superior to those of the cv. Pérola. Moreover making it feasible to use the waste from this cultivar as a source of bromelain. 2: The comparison of five different solutions for the extraction of bromelain (H_2SO_4/Na_2SO_4 pH 4.5; Acetate buffers pH 3.6; 4.0 and 5.0 and phosphate buffer pH 7.0); two methods of fractional precipitation (cold acetone and ammonium sulfate) and three chromatographies techniques (DEAE-cellulose; SP-sepharose and CM-cellulose) from the residues of cv. Vitória were realized. The H_2SO_4/Na_2SO_4 pH 4.5 solution gave the highest yield of total protein with the most proteolytic activity. The comparison of fractional precipitation methodology the fractions produced with 20-50% saturation (F2S) and 50-75 % saturation (F3S) of ammonium sulfate had greater proteolytic activity, with 88.57% and 98.2% activity respectively, than did the fractions produced using cold acetone for the precipitation. For further purification the fraction F3S was applied to three different ion exchange resins. It was found that the CMC best maintained the values of proteolytic activity producing protein with 89.31% activity. 3: A new methodology for purification was then developed by using CMC and Sephadex G-50 to obtain a pre purified bromelain (PF 3.01-93% activity) and purified bromelain (PF 16.86-89% activity). The purity of the bromelain was confirmed by SDS-PAGE, revealing only one band at 30 kDa; by HPLC having only one peak in the first ten minutes and by *Peptide Mass Fingerprint* of the enzyme at the mass spectrometer (MALDI-TOF-MS). In addition fragmentation (MALDI-TOF MS / MS) and sequencing of two peptides *m/z* 951 and 1584. 4: Pre purified bromelain and purified bromelain kinetic characterization was realized. Pre purified bromelain had two optimum temperatures (40 and 60°C) and one optimum pH8 and that the purified bromelain had an optimum temperature of 60°C and an optimum pH of 8. Based on these findings agricultural and processing residues of cv. Vitoria represent a good source of bromelain. The purification methodology developed is innovative, producing bromelain with a high degree of purity, and commercially viable, because of the reduction in the number of steps necessary for purification when compared with the methodology currently in use.

Keywords: Proteolytic enzymes, bromelain, purification.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Distribuição da demanda de enzimas em diferentes áreas.....20
- Figura 2 - Representação esquemática de vários passos e supostos intermediários e estados de transições, no caminho da reação para hidrólise de um substrato amida por uma cisteíno-peptidase.....23
- Figura 3 - Estrutura terciária da bromelina do talo, utilizando como molde a papaína (9PAP). Os resíduos em destaque são referentes a tríade catalítica, estes resíduos são: Cys-26 (amarelo), His-158 (vermelho) e Lys-174 (azul). (A – Frente; B- Lado 1; C – Lado 2; D- Fundo).31
- Figura 4 - Representação esquemática das estratégias de purificação de Bromelina43
- Figura 5- Diagrama de fases genérico representando a curva binodal, linha de amarração (eixo TMF) no ponto M e N e os sistemas monofásico (A) e bifásico (B) em um sistema PEG/Sal ou polímero46

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Classificação de peptidases de acordo com o sítio catalítico..... | 22 |
| Tabela 2 - Composição de aminoácidos da bromelina do caule | 32 |
| Tabela 3 - Massa molecular, pH ótimo e temperatura ótima de bromelina | 35 |
| Tabela 4 - Processos de separação de membranas e suas aplicações..... | 54 |

LISTA DE SIGLAS

| | |
|------------------------------|---|
| ACN | Acetonitrila |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | Sulfato de Amônio |
| AcNa | Acetato de Sódio |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| CMC | Carboximetilcelulose |
| cv. | Cultivar |
| DEAE | Dietilaminoetil |
| EC | Enzyme Commission |
| F1A | Fração 0-20% de acetona gelada |
| F1S | Fração 0-20% de Sulfato de Amônio |
| F2A | Fração 20-50% de acetona gelada |
| F2S | Fração 20-50% de Sulfato de Amônio |
| F3A | Fração 50-75% de acetona gelada |
| F3S | Fração 50-75% de Sulfato de Amônio |
| FAO | <i>Food and Agriculture Organization</i> (Organização de Alimentação e Agricultura) |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FEB | Fração de maior atividade proteolítica do extrato bruto |
| FP | Fator de Purificação |
| H_2SO_4 | Ácido Sulfúrico |
| HPLC | <i>High Performance Liquid Chromatography</i> |
| ID | Internal Diameter (diâmetro interno) |
| Incaper | Instituto Capixaba Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural |
| kDa | Kilo Daltons |
| MS | <i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas) |
| MSDB | Mass Spectrometry protein sequence Data Base |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| Na_2SO_4 | Sulfato de Sódio |
| NaOAc | Acetato de sódio |
| NCBI | Natural Center for Biotechnology Information |
| PEG | Polietilenoglicol |
| pl | Ponto Isoelétrico |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |
| -SH | Radical Sulfidríla |
| SP | Sulfopropil |
| TA | Titrateable acidity (Acidez titulável) |
| TFA | Acido trifluoracético |
| TSS | <i>Total solid solubles</i> (Sólidos solúveis totais) |
| TSS/AT | Ratio Total solid solubles / Titrateable acidity |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 16 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 18 |
| 2.1 BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA E MERCADO | 18 |
| 2.2 ENZIMAS PROTEOLITICAS..... | 20 |
| 2.2.1 Enzimas proteolíticas de interesse para Biotecnologia | 24 |
| 2.2.2 Proteases de origem vegetal | 27 |
| 2.2.2.1 Papaína | 27 |
| 2.2.2.2 Ficina..... | 28 |
| 2.2.2.3 Bromelina | 28 |
| 2.3 BROMELINA: PROPRIEDADES QUÍMICAS E BIOQUÍMICAS | 30 |
| 2.3.1 Propriedades Químicas | 30 |
| 2.3.2 Propriedades Bioquímicas | 32 |
| 2.3.2.1 Massa molecular, pH ótimo e temperatura ótima de Bromelina | 34 |
| 2.4 APLICAÇÕES DA BROMELINA | 36 |
| 2.4.1 Indicações clínicas da bromelina | 37 |
| 2.5 ESTRATEGIAS DE PURIFICAÇÃO DE BROMELINA | 41 |
| 2.5.1 Extração líquido-líquido em sistema de duas fases aquosas | 44 |
| 2.5.2 Sistemas de micelas reversas | 51 |
| 2.5.3 Separação por membranas filtrantes | 53 |
| 2.5.4 Precipitação | 55 |
| 2.5.5 Técnicas Cromatográficas | 58 |
| 3. OBJETIVOS | 62 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL | 62 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS | 62 |
| 4.RESULTADOS E DISCUSSÃO | 63 |

| | |
|---|------------|
| 4.1 CAPÍTULO 1 - Bromelain extraction, activity and chemical characterization at different stages of maturity in two pineapple varieties. | 63 |
| 4.2 CAPÍTULO 2 - Innovation in the bromelain extraction and purification process with of the maintenance of high proteolytic activity | 82 |
| 4.3 CAPÍTULO 3 – Development of new analytical method for bromelain purification from pineapple: ion exchange plus gel filtration chromatographies | 102 |
| 4.4 CAPÍTULO 4 - Kinetic characterization of bromelain obtained from pineapple plant residues (<i>Ananas comosus</i> var. <i>comosus</i>) cv. Vitória..... | 121 |
| 5.CONCLUSÕES | 136 |
| 6.REFERENCIAS..... | 139 |
| APÊNDICE..... | 149 |
| APENDICE A – Depósito de Patente “Processo de Purificação de Bromelina, Bromelina purificada e usos da enzima purificada” | 150 |

1 INTRODUÇÃO

A importância da sustentabilidade nas atividades produtivas tem sido amplamente reconhecida, havendo a necessidade da substituição de processos químicos baseados em insumos não renováveis por processos químicos ou bioquímicos que utilizem insumos renováveis. Reconhece-se também a necessidade da substituição das múltiplas etapas de processos químicos por processos biotecnológicos mais eficientes (BON et al., 2008).

Muitas das reações que são catalisadas quimicamente atualmente estão sendo cada vez mais substituídos por enzimas. Dentre as inúmeras vantagens de sua utilização, merece destaque o fato delas serem ecologicamente mais viáveis. Com o advento da biotecnologia nos últimos anos, o desenvolvimento de novas estratégias de purificação e da utilização de matérias primas foi facilitado. Matérias primas estas antes sem destino (BON et al., 2008; MONTEIRO; SILVA, 2009).

Em decorrência destas necessidades e tendências, é notório o aumento significativo do consumo e demanda de produção de enzimas em nível internacional, por possuírem amplas aplicações industriais e terapêuticas. Este cenário é particularmente importante para o Brasil, país que necessita inserir-se de forma mais representativa como usuário e provedor de enzimas e tecnologia enzimática (MONTEIRO; SILVA, 2009).

O Brasil, hoje, é um país essencialmente importador de enzimas, além de apresentar um uso ainda reduzido em processos industriais quando comparado com outros países. As proteases, por exemplo, são as enzimas consideradas mais importantes de todas as enzimas industriais e compreendem cerca de 60% das enzimas utilizadas. Apresentam importância nas indústrias de alimentos, detergentes, farmacêutica e até no processamento do couro (GARCIA-CARREÑO et al., 1997 citado por CABRAL, 2001; MONTEIRO; SILVA, 2009; GONZALEZ-RÁBADE et al., 2011; BALA et al., 2012).

As proteases podem ser obtidas a partir de diversas fontes, destacando-se as de origem microbiana, animal e vegetal. O Brasil tem uma grande variedade de vegetais que podem constituir fontes inesgotáveis de enzimas (RAO, 1998; FATIBELLO; VIEIRA, 2002).

Dentre as proteases existentes, merece destaque a bromelina, uma cisteíno-protease, que está presente em plantas da família Bromeliaceae no qual o abacaxizeiro é sua principal fonte de obtenção. Seu destaque vai além de sua ampla aplicação e interesse industrial, pois pode ser obtida a partir de resíduos agrícolas e agroindustriais do abacaxizeiro o que reforça a mentalidade sustentável (MYNOTT, 1997; BERTEVELLO, 2001; MAURER, 2001; NADIZARAH et al., 2013).

Atualmente o país está entre os maiores produtores mundiais de abacaxi. O fruto é o único que possui concentrações relativamente altas de proteases no estado maduro. Com o surgimento de novas variedades de abacaxizeiro, a exemplo a cv. Vitória, que é resistente á fusariose, novas fontes potenciais de obtenção de bromelina podem ser exploradas no intuito de avaliar concentrações e rendimentos da enzima (CÉSAR, 2005; VENTURA et al., 2009).

A bromelina comercial é um produto de alto valor agregado. Isto se deve aos altos custos dos processos atualmente disponíveis de sua purificação e obtenção, o que levou ao desenvolvimento de várias estratégias de purificação (BALA et al., 2012).

No entanto, os processos atualmente disponíveis para extração e purificação de bromelina são muitas vezes bem trabalhosos, e frequentemente resultam rendimentos baixos. Assim, o desenvolvimento de novas técnicas de purificação é necessário, visando o aumento do rendimento global da atividade da enzima e ao mesmo tempo a diminuição do número de passos envolvidos na purificação, o que conseqüentemente levará a uma diminuição do custo do produto final e ainda, viabilizará a possibilidade do país em se tornar um importante produtor desta enzima (COSTA, 2010; BALA et al., 2012).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA E MERCADO

Os processos industriais que envolvem reações químicas estão presentes na maioria das manufaturas de produtos ou bens consumidos pelo homem. Muitas dessas reações são catalisadas quimicamente que podem ser substituídos por enzimas. As enzimas apresentam como grandes vantagens serem ecologicamente mais viáveis. A cada dia presenciam-se mais processos industriais que utilizam enzimas como catalisadores. Esses biocatalisadores podem ser extraídos de tecidos animais, vegetais e de microrganismos (MONTEIRO; SILVA, 2009; COSTA, 2010).

O mercado de enzimas está dividido em dois grandes segmentos: enzimas industriais (enzimas técnicas, enzimas para indústria de alimentos e enzimas para ração animal) e enzimas especiais (enzimas terapêuticas, enzimas para diagnóstico, enzimas para química quiral e enzimas para pesquisa) (BON et al., 2008).

Existe um aumento mundial no consumo de enzimas industriais. O Brasil, hoje, é um país essencialmente importador de enzimas, só de bromelina, por exemplo, o país importou no período de janeiro a novembro de 2013 um total 1.212 Kg (1 g de bromelina ≈ R\$25,00). Além disso, o país apresenta um uso ainda reduzido de enzimas em processos industriais quando comparado com outros países. Assim, a inserção e consolidação do Brasil como produtor de tecnologia enzimática e enzimas faz-se necessário (MONTEIRO; SILVA, 2009; MIDIC/SECEX, 2014).

Compatibilizar o desenvolvimento econômico com a proteção do meio ambiente, mediante o uso racional dos recursos naturais, a preservação e a recuperação do meio ambiente e o controle da poluição são os objetivos centrais das novas abordagens industriais e econômicas, muitas delas utilizando a biocatálise. Frequentemente se depara com aplicações versáteis da tecnologia enzimática em muitos setores industriais. Uma das maneiras mais ricas de analisar a evolução de um tipo de indústria e, ao mesmo tempo, observar as tendências de seu desenvolvimento futuro é por meio das informações contidas nas patentes de

invenção, que guardam a evolução do estado da arte e contam a história da produção de enzimas (BON et al., 2008).

A investigação e o desenvolvimento de enzimas com aplicação industrial e o seu espaço de mercado estão subdivididos em várias categorias. As empresas produzem enzimas para bens de consumo usadas diretamente na formulação de detergentes e produtos de limpeza, ou indiretamente, na indústria transformadora, bem como na valorização de processos na indústria têxtil, de couros, de papel e celulose, de bebidas fermentadas e produtos alimentares. As enzimas são usadas igualmente na formulação de rações animais (BON et al., 2008).

Outras empresas desenvolvem sistemas industriais de conversão de biomassa para transformação enzimática de resíduos agrícolas em etanol, usando por exemplo, o amido de milho (HARDIN, 1996).

Ultimamente, verifica-se a introdução de enzimas na produção de plásticos derivados de matéria-prima não originada do petróleo, na produção de fontes alternativas de energia, como os biocombustíveis. Existem também, empresas fornecedoras de tecnologia, que detêm elevado nível de conhecimento e propriedade intelectual em micro-organismos, através de processos usando engenharia genética (BON et al., 2008).

A maior fatia de absorção de enzimas é a indústria farmacêutica (Figura 1) em que o crescimento é mantido pela substituição de terapias tradicionais por terapias enzimáticas. Espera-se para os próximos anos um crescimento significativo do mercado de novos produtos (FREEDONIA, 2002). Depois dos antibióticos, as enzimas são os produtos mais explorados na indústria de biotecnologia (OLIVEIRA et al., 2006).

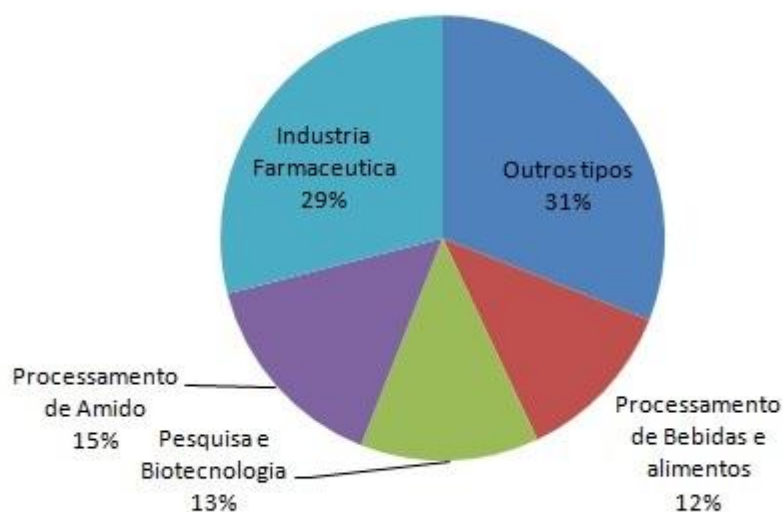


Figura 1 – Distribuição da demanda de enzimas em diferentes áreas. Fonte: Monteiro; Silva (2009)

As numerosas aplicações industriais e terapêuticas de enzimas tem aumentado a demanda de suas produções. As proteases são enzimas consideradas mais importantes de todas as enzimas industriais, com venda anual de cerca de 3 bilhões de dólares (LEARY et al., 2009). Representando cerca de 60% de todas as enzimas comerciais em todo o mundo. As proteases vêm ganhando atenção única no campo da biotecnologia e da medicina, devido às suas propriedades exploráveis (químicas e terapêuticas) (BALA et al., 2012).

2.2 ENZIMAS PROTEOLITICAS

O estudo das proteases iniciou-se no fim do século XVI motivado pelo interesse na fisiologia do sistema digestivo humano. Entretanto, já na antiguidade, tecidos animais, vegetais e outros materiais biológicos ricos em proteases eram, de forma empírica, usados no preparo de queijos e no tratamento dos couros, tendo sido as proteases as primeiras enzimas com aplicação tecnológica (BON et al., 2008).

As enzimas proteolíticas, proteases ou proteinases são enzimas hidrolíticas que clivam ligações peptídicas nas proteínas e em fragmentos de proteínas (peptídeo e aminoácidos). Elas têm presença universal nos seres vivos e representam cerca de 2% do total de proteínas presentes em todos os organismos (FEIJOO-SIOTA; VILLA, 2011).

Apesar de todas terem essa característica funcional comum, elas diferem acentuadamente no seu grau de especificidade (STRYER, 1996, citado por CABRAL, 2001).

Segundo o Comitê de Nomenclatura Enzimática (EC), as peptidases são enzimas que pertencem à classe 3 (hidrolases) e a subclasse 3.4 (peptídeo-hidrolases ou peptidases). As peptidases (EC 3.4) que clivam ligações no interior da cadeia polipeptídica são classificadas como endopeptidases, (EC 3.4.21-99) e as que atuam nas extremidades da cadeia, de exopeptidases (E.C. 3.4.11-19) (BON et al., 2008).

As exopeptidases que atuam na região N-terminal da proteína são classificadas como aminopeptidases e as que atuam na região C-terminal são denominadas carboxipeptidases (BON et al., 2008).

Entretanto, a especificidade das proteases não se relaciona apenas à posição da ligação peptídica ou ao tamanho da cadeia de resíduos de aminoácidos, existindo também seletividade em relação à seqüência de aminoácidos vizinhos à ligação. Hartley, em 1960, propôs uma classificação baseada na estrutura química do centro ativo. Segundo esta classificação as exopeptidases e as endopeptidases são divididas em subclasses de acordo com os grupos químicos (Tabela 1), do centro ativo envolvidos no mecanismo catalítico (BON et al., 2008).

Tabela 1 - Classificação de peptidases de acordo com o sítio catalítico

| Peptidases | EC Subclasses |
|---|----------------------|
| Carboxipeptidases | |
| Serina-carboxipeptidase | 3.4.16 |
| Metalo-carboxipeptidase | 3.4.17 |
| Cisteína-carboxipeptidase | 3.4.18 |
| Endopeptidases | |
| Serina-endopeptidase | 3.4.21 |
| Cisteína-endopeptidase | 3.4.22 |
| Aspártico-endopeptidase | 3.4.23 |
| Metalo-endopeptidase | 3.4.24 |
| Treonina-endopeptidase | 3.4.25 |
| Endopeptidase com mecanismo catalítico desconhecido | 3.4.99 |

Fonte: Bon et al. (2008).

Entre as peptidases descritas, merece destaque a família das cisteíno-peptidases, que apresenta ampla distribuição nos organismos, sendo encontrados em procariotos e eucariotos. O mecanismo catalítico dessa enzima envolve um grupo cisteínico (-SH) em seu sítio ativo (DUBEY et al., 2007; GONZÁLEZ-RABADE et al., 2011; BALA et al., 2012).

Na reação de hidrólise da ligação peptídica, o primeiro passo corresponde no caminho da associação (ou ligação não covalente) da enzima livre (I) com o substrato, para formar o complexo de Michaelis (II). Este passo é seguido pela acilação da enzima (III a), com a formação e liberação do primeiro produto da enzima, a amina R_1NH_2 . No passo seguinte, a acil-enzima (III b), reage com uma molécula de água para formar o segundo produto (passo da desacilação). A liberação deste produto resulta na regeneração da enzima livre (STORER et al., 1994, citados por CABRAL, 2001).

Acredita-se que muitos passos intermediários e ou estados de transição possam existir ao longo destes caminhos, baseado em dados experimentais e por analogia

com as serino-proteases, sendo proposto que a acilação e desacilação envolve a formação de intermediários transitórios tetraédricos (TH₁ e TH₂). Em adição, 4 estados de transição (TS₁, TS₂, TS₃, e TS₄) separam o complexo de Michaelis acil-enzima do complexo enzima produto dos dois intermediários tetraédricos (STORER et al., 1994, citados por CABRAL, 2001) (Figura 2).

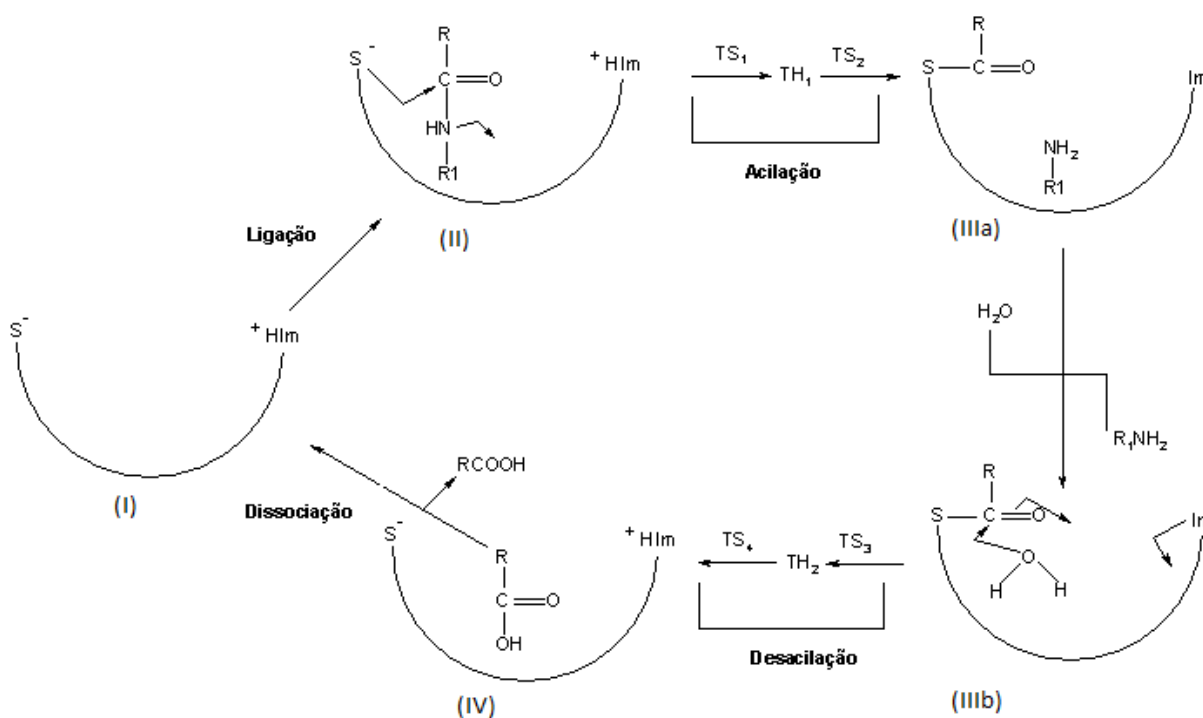


Figura 2 -Representação esquemática de vários passos e supostos intermediários e estados de transições, no caminho da reação para hidrólise de um substrato amida por uma cisteína-peptidase. Fonte: Adaptada e modificada de Cabral (2001).

As peptidases de mamíferos desempenham um papel importante em vários processos tais como a diferenciação celular, agregação de plaquetas, morte celular (apoptose), degradação de proteínas danificadas ou de proteínas que já cumpriram sua finalidade (MÉNARD, 1993, citado por CABRAL, 2001).

Estas enzimas estão envolvidas também no metabolismo através de modificação covalente de proteínas e pró-enzimas, com a digestão de proteínas de alimentos, a mobilização de proteínas para os tecidos, hormônios, e recentemente a descoberta dos proteossomas que estão envolvidos na degradação intracelular de proteínas em conjunto com a ubiquitina. O proteossoma é um arranjo polimérico de subunidades

de peptidases que seletivamente hidrolisa proteínas como um mecanismo de regulação celular, onde proteínas marcadas por ubiquitina sofrem hidrólise pelo proteossoma (GARCÍA-CARREÑO et al., 1997, citados por CABRAL, 2001). As ações das peptidases são controladas por mecanismos que envolvem controle gênico, produção de zimogênios e sua ativação e inibição de enzimas (GARCIA-CARREÑO et al., 1997, citados por CABRAL, 2001).

Em plantas acredita-se que as cisteíno peptidases estejam envolvidas com a morte celular programada durante a senescência (JUNG et al., 2008), e também em seus principais mecanismos de defesas (KONNO et al., 2004). A bromelina no abacaxi, por exemplo, tem um papel importantíssimo na senescência e no processo de amadurecimento dos frutos (NEUTEBOOM et al., 2009). A papaína no látex do mamão atua na proteção dessas plantas ao ataque de insetos herbívoros (KONNO et al., 2004).

Jung et al. (2008) ao superexpressar o gene da bromelina em couve chinesa notaram que, as plantas que superexpressavam bromelina apresentavam uma resistência a *Pectobacterium carotovorum ssp. carotovorum*, bactéria causadora da podridão mole, doença responsável por causar sérios danos a plantas e perdas econômicas em muitas culturas tais como, cenoura, rabanete, batata e couve.

2.2.1 Enzimas proteolíticas de interesse para Biotecnologia

As enzimas proteolíticas ou proteases constituem o mais importante grupo de enzimas de interesse industrial, e compreendem cerca de 60% das enzimas utilizadas. Apresentam importância nas indústrias de alimentos, detergentes, farmacêutica e até no processamento do couro (GARCÍA-CARREÑO et al., 1997, citado por CABRAL, 2001; COSTA et al., 2009; GONZALEZ-RÁBADE et al., 2011; BALA et al., 2012).

A relevância biotecnológica deste grupo de enzimas, rico em diversidade estrutural e mecanismo de ação, reflete-se atualmente na importância qualitativa e quantitativa das suas aplicações como enzimas industriais e especiais (BON et al., 2008).

Na indústria de alimentos, as peptidases possuem um papel de destaque porque catalisam a hidrólise de uma ligação específica em um determinado peptídeo, o que permite modificações pontuais em sistemas complexos, como os alimentos, melhorando o sabor, o aroma, a textura, a funcionalidade e a qualidade nutricional. Este processo, sem dúvida, é mais eficaz do que um processo físico ou químico que pode afetar todas as outras moléculas presentes no alimento. Alguns exemplos do uso das peptidases na modificação de alimentos incluem: a redução do sabor amargo de queijos, a substituição de gorduras e carboidratos por proteínas modificadas enzimaticamente que proporcionam propriedades organolépticas similares; a restauração das propriedades emulsificantes de proteínas da soja desnaturada pelo calor; e a redução do potencial alergênico de alimentos protéicos através da degradação de epítomos. Além disso, as peptidases podem agir sobre proteínas complexas, como as do soro de leite e a caseína, gerando peptídeos biologicamente ativos com papel significativo na manutenção da vida e prevenção de doenças, como peptídeos anti-hipertensivos que inibem a enzima conversora de angiotensina, e peptídeos que atuam na supressão do apetite pela produção de colecistoquinina, um hormônio intestinal, que produz a sensação de saciedade, agindo nos centros cerebrais de controle de apetite (BON et al., 2008).

Na indústria de detergentes, as peptidases deixaram de ser simples aditivos às formulações destes produtos e passaram a ser ingredientes essenciais em consequência do melhor desempenho de lavagem e manutenção da cor dos tecidos. O interesse industrial pela engenharia de proteínas vem aumentando gradativamente, com o objetivo de obter enzimas modificadas com uma maior estabilidade a agentes oxidantes e alvejantes e em ampla faixa de pH. Além disso, as peptidases também contribuem para as formulações serem menos agressivas para o ambiente, porque diminuem o consumo de água e de energia e reduzem a adição de solventes tóxicos, ácidos e produtos cáusticos. Por isso, as empresas apostam na substituição gradual de muitos componentes químicos pelas enzimas,

resultando em produtos de maior valor agregado, pela sua qualidade e por serem produzidos por tecnologias limpas (BON et al., 2008).

Na indústria farmacêutica, diversos fármacos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de inibir peptidases. O uso de enzimas como alvo quimioterápico é motivado pela distribuição ubíqua destas enzimas, sua participação em diversos processos fisiológicos em humanos e seu envolvimento em questões cruciais da interação de patógeno com seus hospedeiros (BON et al., 2008).

As cisteíno peptidases são alvo de intensa pesquisa por inúmeras companhias farmacêuticas, isto porque estão envolvidas em inúmeras funções celulares, como *turnover* de proteínas, a ativação de proenzimas, a reabsorção óssea, a apresentação e o processamento de antígenos, homeostase da epiderme e a maturação de hormônios (BON et al., 2008).

As enzimas proteolíticas também podem ser utilizadas em processos de biotecnologia, tal como na extração de DNA de células de eucariotos (GEHELHU et al., 1998; CABRAL et al., 2000 citados por CABRAL, 2001).

Como as proteases são fisiologicamente necessárias a todos os organismos vivos, são encontradas e podem ser obtidas a partir de diferentes fontes, tais como microorganismos, animais e plantas (RAO, 1998).

Os microorganismos representam uma excelente fonte de enzimas, devido à sua ampla diversidade bioquímica e sua suscetibilidade para manipulação genética. Podem ser utilizados, bactérias, fungos e vírus como fonte de obtenção (RAO, 1998).

As enzimas de origem animal, tais como: pancreatina, renina, tripsina, pepsina, quimiotripsina são obtidas a partir de tecidos específicos e apresentam grande importância industrial. O único inconveniente é que para sua produção é necessário a disponibilidade de gado para abate, que por sua vez é regida por políticas públicas e agrícolas (RAO, 1998; PARK, 2001).

O número de proteases utilizadas industrialmente de origem vegetal é restrito, as principais enzimas com boa aceitação comercial são as cisteíno-proteases (CPs) e compreendem a papaína do mamão (*Carica papaya* L.), ficina do figo (*Ficus carica* L.) e bromelina do abacaxi (*Ananas comosus* var. *comosus*) (DUBEY, 2007; FEIJOO-SIOTA; VILLA, 2011; MUNTARI et al., 2012).

O Brasil tem uma grande variedade de plantas cultivadas que podem constituir fontes inesgotáveis de enzimas para serem aplicados nas mais diversas áreas do conhecimento (FATIBELLO; VIEIRA, 2002).

2.2.2 Proteases de origem vegetal

2.2.2.1 Papaína

A papaína é um constituinte do látex do fruto verde de mamão. O látex bruto seco em pó é comumente descrito como papaína. O látex fresco apresenta uma alta atividade proteolítica, sendo que mais da metade da proteína total contida no látex é inicialmente ativa, porém facilmente inativada pela oxidação. As papaínas comerciais não são armazenadas por longos períodos e frequentemente perdem a sua atividade em poucos meses. Por outro lado, as folhas e talos, enfim a planta como um todo, com exceção das raízes, contêm quantidades significantes da enzima, que pode ser extraída como suco prensado e posteriormente purificada (PARK, 2001).

A papaína tem ação semelhante à da pepsina e tripsina, empregado nas indústrias têxtil, farmacêutica, de alimentos e de cosméticos (SIQUEIRA, 2003; ARAVIND, G., 2013).

Para a indústria farmacêutica a papaína apresenta inúmeros interesses. A enzima tem sido utilizada como digestiva, além do seu uso no debridamento de feridas e cicatrização (LEITE et al., 2012). Em relação a indicações clínicas a papaina apresentou um potente efeito anti-angiogenico (MOHR; DESSER, 2013).

2.2.2.2 Ficina

Ficina é uma protease similar em muitos aspectos à papaína (PARK, 2001). A ficina atua sobre as proteínas estruturais da carne, sendo assim um ótimo amaciante (PEDREIRA, 2001).

A ficina está presente no látex de certas espécies de *Ficus*. Estas também possuem outras enzimas proteolíticas. Uma grande quantidade de matéria vegetal é requerida para produção de uma quantidade relativamente pequena de ficina tornando-a economicamente inviável (PARK, 2001; ZARE, 2013).

2.2.2.3 Bromelina

Bromelina é o nome genérico dado ao conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nas plantas da família da Bromeliaceae, da qual o abacaxi (*Ananas comosus* var. *comosus*) é o mais conhecido (MAURER, 2001; NADIZARAH et al., 2013).

A bromelina têm tido ampla aplicação na indústria de alimentos, mas elas podem ser utilizadas também em indicações clínicas, tais como: agentes antitumorais, modulação imune, limpeza de feridas, aumento do efeito de antibióticos, ação anti-inflamatória, ação mucolítica, auxílio na digestão, aplicações em doenças cardiovasculares e circulatórias, em procedimentos cirúrgicos e ferimentos da musculatura esquelética (CABRAL, 2001; AICHELE et al., 2013).

Na indústria de alimentos, a bromelina pode ser utilizada no amaciamento de carnes vermelhas, na produção de pães e biscoitos a partir de farinhas de trigo de alto teor de proteínas, na produção de ovos desidratados, na preparação de leite de soja e isolados protéicos, na cervejaria para hidrolisar certos complexos proteínas-tanino, formados durante a fermentação, que se presentes na cerveja, tornam-se insolúveis e formam turvações quando gelada (FREIMAN; SABAA, 1999).

O fruto do abacaxi é normalmente utilizado como alimento, os caules são considerados resíduos sendo assim uma boa fonte de obtenção de bromelina. Além disso, diferentes partes da planta podem ser usadas como matéria-prima para a obtenção da bromelina tais como, folhas, talos, polpa da fruta, cascas e resíduos industriais do processamento do fruto (TOCHI et al., 2008; HEBBAR et al., 2008; KETNAWA et al., 2012; NADIZARAH, 2013).

A bromelina não está presente nos primeiros estágios de desenvolvimento do fruto, porém, seu nível aumenta, rapidamente, mantendo-se elevado até o amadurecimento, onde tem um pequeno decréscimo. Esta é uma das vantagens da utilização e purificação das proteases do abacaxi (LOPES et al., 2005).

Apesar da diminuição da atividade proteolítica durante a maturação, o abacaxi é o único fruto que possui concentrações relativamente altas de proteases no estado maduro. No mamão e no figo, tanto a papaína como a ficina, somente são encontradas em altos níveis quando o fruto está verde; com o completo amadurecimento, a concentração de proteases praticamente desaparece (CESAR, 2005).

O Brasil diferencia-se completamente dos grandes produtores e consumidores mundiais de abacaxi, pois quase toda sua produção é consumida na forma fresca, sendo a quantidade industrializada insignificante (BERTEVELLO, 2001). Uma das principais fontes de matéria prima para a extração de enzimas proteolíticas no Brasil, não seriam os subprodutos do processamento da fruta e sim os resíduos agrícolas, especialmente o caule que tem demonstrado bons resultados nos mais recentes estudos de extração e purificação de enzimas e nas aplicações terapêuticas da bromelina (MYNOTT, 1997; RABELO, 2004 citados por CESAR, 2005).

Com o advento do programa de melhoramento genético do abacaxi, iniciado em 1984, novas cultivares tem sido utilizadas por agricultores no país. No geral, obter cultivares produtivas, adaptadas às condições climáticas locais, com melhores características nutricionais, mais atrativas ao mercado consumidor e resistentes às

mais importantes pragas e doenças são os objetivos do programa (CABRAL; SOUZA; FERREIRA, 1999).

A exemplo desse avanço está a cv. Vitória, resistente à fusariose causada pelo fungo *Fusarium guttiforme* Nirenberg & O'Donnell (sin.: *F. subglutinans* f. sp. *ananas* Ventura, Zambolim & Gilb.), lançada em novembro de 2006. Com isso, o conhecimento das propriedades bioquímicas da bromelina nessas novas cultivares e conseqüentemente o estudo da utilização dos seus resíduos agrícolas como potenciais fontes de obtenção dessa enzima, agrega valor ao agronegócio do abacaxi (GOMES et al., 2003; VENTURA et al., 2006; COSTA, FERNANDES, VENTURA, 2008; VENTURA et al., 2009; COSTA; 2010).

2.3 BROMELINA: PROPRIEDADES QUÍMICAS E BIOQUÍMICAS

2.3.1 Propriedades Químicas

A bromelina ficou conhecida quimicamente desde 1875 e em 1957 foi introduzida como um composto terapêutico (KELLY, 1996; PAVAN et al., 2012).

A bromelina do caule apresenta um grupo sulfidrílico reativo por molécula, que é essencial para a catálise enzimática (BELITZ et al., 2009).

A atividade da bromelina e das demais cisteíno-proteases, depende da presença, no sítio catalítico, de um resíduo de cisteína e outro de histidina. O imidazol de um resíduo de histidina usualmente funciona como um catalisador ácido-base, e aumenta o caráter nucleofílico dos grupos tiólico e hidroxila (Figuras 2; 3) (RAWLINGS ;BARRETT, 1994; FERSHT, 1995 citados por CABRAL, 2001).

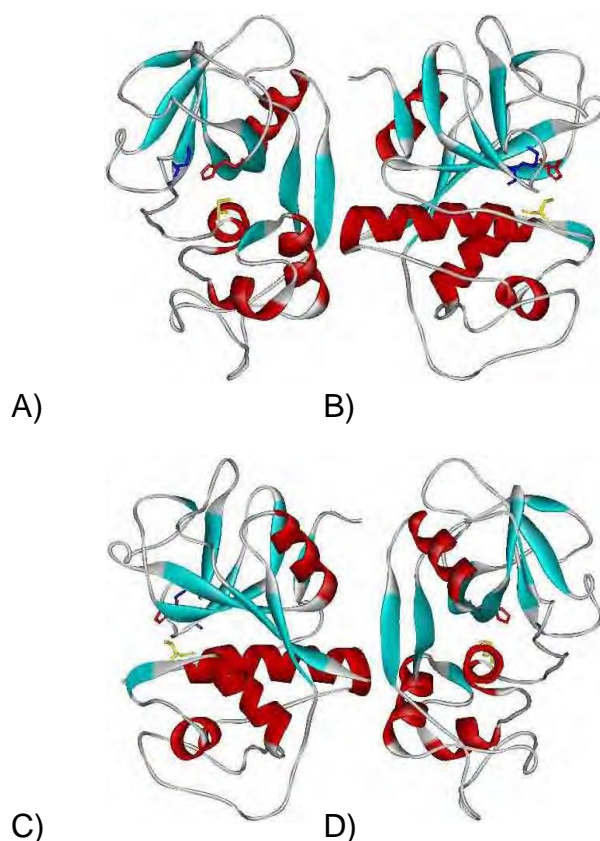


Figura 3 - Estrutura terciária da bromelina do talo, utilizando como molde a papaína (9PAP). Os resíduos em destaque são referentes a tríade catalítica, estes resíduos são: Cys-26 (amarelo), His-158 (vermelho) e Lys-174 (azul). (A – Frente; B- Lado 1; C – Lado 2; D- Fundo). Fonte: Cabral (2001).

A enzima é composta por muitos aminoácidos que podem ser determinados. Além disso, é uma glicoproteína que tem um oligossacarídeo por molécula, o qual encontra-se covalentemente ligado a uma cadeia polipeptídica. Apresenta como principal resíduo aminoterminal a valina, e como resíduo carboxiterminal a glicina (Tabela 2).

Tabela 2 – Composição de aminoácidos da bromelina do caule

| Aminoácidos | Murachi (1964) | Ota-Y-Stein (1964) | Sfinstein Ywllitaker (1964) | Husain Lowe (1968)* |
|-----------------|-------------------|-----------------------|--------------------------------|------------------------|
| Lisina | 20 | 23 | 12 | 20,2 |
| Histidina | 1 | 2 | 1 | 1,34 |
| Arginina | 10 | 12 | 6 | 10,2 |
| Ácido Aspártico | 27 | 29 | 16 | 28,9 |
| Treonina | 12 | 14 | 8 | 12,4 |
| Serina | 24 | 28 | 16 | 24,9 |
| Ácido Glutâmico | 20 | 23 | 12 | 23,0 |
| Prolina | 13 | 14 | 8 | 13,1 |
| Glicina | 29 | 35 | 19 | 30,5 |
| Alanina | 30 | 35 | 20 | 32,4 |
| Cisteína | 11 | 10 | 5 | 7,4 |
| Valina | 19 | 22 | 12 | 20,7 |
| Metionina | 4 | 5 | 2 | 5,0 |
| Isoleucina | 20 | 21 | 12 | 18,4 |
| Leucina | 9 | 10 | 5 | 9,0 |
| Tirosina | 19 | 21 | 11 | 18,2 |
| Fenilalanina | 9 | 9 | 5 | 8,0 |
| Triptofano | 8 | 8 | 5 | - |
| Total | (285) | (321) | (179) | - |
| Amônio | 25 | 42 | 19 | - |
| Glucosamina | 2 | 6 | 4 | - |
| Carboidratos | 2,0 | 1,46 | 2,0 | - |

*Média de uma análise realizada em triplicata

Fonte: Adaptada e modificada de Fajardo (1998).

2.3.2 Propriedades Bioquímicas

A bromelina é encontrada em toda a planta do abacaxizeiro: caule, raízes, folhas e frutos e coroa, sendo que as enzimas encontradas no caule recebem nome de bromelina do caule e têm número sistemático, de acordo com o *Enzyme Commission*, EC 3.4.22.32 (CAMPESE, 2004), anteriormente EC 3.4.22.4 (HALE, 2005). As enzimas do fruto recebem nome de bromelina do fruto e tem número sistemático EC 3.4.22.33 (CAMPESE, 2004), anteriormente EC 3.4.22.4 e 3.422.5 (HALE, 2005).

A bromelina do caule é a protease mais abundante presente em extratos de abacaxi, enquanto que a maior fração presente no suco é da bromelina do fruto. Outras cisteíno-proteases também estão presentes nos extratos obtidos a partir do caule do

abacaxi tais como, ananaina (EC 3.4.22.31) e comosaina (LAROCCA et al., 2010; BALA et al., 2012).

O extrato aquoso proveniente de bromelina do caule e do fruto é conhecido como o nome de bromelina. Dessa forma, bromelina compreende uma mistura de diferentes cisteino-proteases, que apresentam sequencia de aminoácidos similares, porém distintas na atividade proteolítica quanto na sensibilidade de inativação (HALE et al., 2005; PAVAN et al., 2012).

A bromelina do caule (EC 3.4.22.32) apresenta 8 componentes ativos (denominadas frações: F), sendo que F4 e F5 (aproximadamente 25 kDa) são os dois principais. A fração considerada mais ativa é a F9, que compreende 2% do total de proteínas. Foi estimado que 50% das proteínas em F4 e F5 são glicosiladas. A fração F9, no entanto, não é glicosilada e apresenta um massa molecular de aproximadamente 23 kDa (BHATTACHARYYA, 2008). O complexo de enzimas proteolíticas bromelina apresenta massa molar próxima a 31 kDa (MARTINS; NISIDA; BALDINI, 1992).

Outra proteinase que está presente em pouca quantidade inclui a bromelina da fruta (EC 3.4.22.33) a principal proteinase presente no fruto do abacaxi (HALE et al., 2005). Diversos modelos de substratos peptídicos na forma de B-(P3)-P2-P1 indicador (onde o grupo de B= bloqueador, tal como Z= benziloxycarboni ou Bz= benzoil, e P1, P2, e P3 representam aminoácidos específicos) foram usados para caracterizar a atividade proteolítica de enzimas purificadas da bromelina. A clivagem amidolítica do substrato resulta na liberação do indicador livre que pode ser detectada por fluorescência ou colorimetricamente. A bromelina do caule cliva preferencialmente o modelo de substrato Z-Arg-Arg, visto que a bromelina da fruta mostra atividade mínima contra esse substrato. Em contrapartida, a bromelina do fruto cliva eficientemente o substrato de Bz-Phe-Val-Arg (ROWAN et al., 1998; NAPPER et al., 1994, citados por HALE et al., 2005).

A atividade enzimática de bromelina compreende um amplo espectro entre 5.5 a 8 de pH e estabilidade ótima de 4,5 – 6,5. Apresenta um ponto isoelétrico (pI) de 9,55 (HERNANDEZ et al., 2005; BELITZ et al., 2009; BALA et al., 2012).

A bromelina do caule é amplamente utilizada na indústria e na medicina, entretanto a bromelina do fruto não está disponível comercialmente (LAROCCA et al., 2010).

2.3.2.1 Massa molecular, pH ótimo e temperatura ótima de bromelina

As preparações comerciais de bromelina são avaliadas de acordo com sua atividade proteolítica, uma vez que todos os usos dessa enzima estão baseados em sua atividade, no qual são medidas as condições ótimas das reações enzimáticas (FRANCA-SANTOS et al., 2009; BALA et al., 2012).

A atividade de bromelina pode ser determinada em condições ótimas de pH, e temperatura, com vários substratos, que incluem, caseína, gelatina e substratos sintéticos (BALA et al., 2012).

A bromelina do caule apresenta uma massa molecular entre 23,8 e 37 kDa, pH ótimo entre 4,6 – 8,5, e temperatura ótima entre 25 – 60 ° C. Em relação a bromelina do fruto foi encontrado massa molar variando entre 24,5 – 33 kDa, pH ótimo 2,9-8 e temperatura ótima 37 – 70 ° C (Tabela 3) (Adaptado e modificado de BALA et al., 2012).

Alguns fatores podem ser levados em consideração nessa divergência encontrada na literatura, tais como, o tipo de substrato utilizado no experimento de atividade, e o tempo de contato da enzima com o substrato. Por exemplo, em relação ao tipo de substrato, dependendo do substrato utilizado a enzima pode ser mais ou menos resistente a determinados valores de temperaturas o que pode influenciar na determinação da temperatura ótima (FRANÇA-SANTOS et al., 2009).

Tabela 3–Massa molecular, pH ótimo e temperatura ótima de bromelina

| Tipo de Bromelina | Massa Molar (kDa) | pH ótimo | Temperatura ótima (°C) | Referência |
|--------------------------|--------------------------|-----------------|-------------------------------|--|
| Caule | - | 7-8.5 | - | MINAMI; DOI; HATA; 1971 |
| Caule | 37 | 7 | 60 | SUH et al. ,1992 |
| Fruto | 32,5 | 8 | 70 | |
| Caule | - | 4.6 | 25 | HATANO, K., TANOKURA, M.; TAKAHASHI 1998 |
| Caule | - | 6-7 | 60 | HARRACH et al., 1998 |
| Caule | - | 7 | 37 | RASHEEDI; HAQ; KHAN, 2003 |
| Caule | 23,8 | 6-7.5 | 60 | GUPTA; MAQBOOL; SALEMUDDIN, 2007 |
| Caule | - | 8 | 60 | MAHMOOD; SALEEMUDDIN, 2007 |
| Caule | - | 8 | 60 | KHATOON; YOUNUS; SALEEMUDDIN, 2007 |
| Fruto | 24.5 | - | - | LOPES et al., 2009 |
| Caule | 26 | - | - | XUE et al., 2010 |
| Caule | - | 7 | 55 | KETNAWA; RAWDKUEN; CHAIWUT, 2010 |
| Fruto | - | - | 40 | JUTAMONGKON; CHAROENREIN, 2010 |
| Caule | 30 | - | - | GAUTAN et al., 2010 |
| Caule | 29 | 8 | 60 | KETNAWA; CHAIWUT; RAWDKUEN, 2011a |
| Caule | - | 3-9 | 50-60 | KETNAWA; CHAIWUT; RAWDKUEN, 2011b |
| Fruto | - | 2.9-7.7 | 37-59 | CORZO et al., 2011 |
| Caule | 29 | - | - | KUMAR; HEMAVATHI; HEBBAR, 2011 |
| Caule | - | - | 50-60 | LIANG et al., 2011 |
| Fruto | - | 6 | 70 | SILVESTRE et al., 2012 |
| Fruto | 33 | - | - | ARUMUGAM; PONNUSAMI, 2013 |

Fonte: Adaptada e modificada de Bala et al. (2012).

2.4 APLICAÇÕES DA BROMELINA

As bromélias são reconhecidas como plantas medicinais desde 1957 e, neste mesmo ano, a bromelina foi introduzida como composto terapêutico, com as seguintes propriedades: inibição da agregação plaquetária, atividade fibrinolítica, ação anti-inflamatória e antitumoral, modulação de citocinas e imunidade, propriedade desbridante da pele, aumento da absorção de outras drogas, propriedades mucolíticas, facilitador da digestão, acelerador da cicatrização, melhora a circulação e sistema cardiovascular (CESAR, 2005).

Em 06 de março de 2009, o Ministério da Saúde divulgou uma lista com 71 plantas de interesse do SUS. Entre as plantas, encontra-se o abacaxi, que apresenta como características de uso popular, algumas das indicações da bromelina tais como, mucolítica e fluidificante das secreções e das vias aéreas superiores. O objetivo da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (Rennisus) é orientar estudos que possam subsidiar a elaboração da relação de fitoterápicos disponíveis para uso da população, com segurança e eficácia para o tratamento de determinadas doenças (BRASIL, 2009).

Em um dos mercados mais promissores na indústria farmacêutica, a bromelina vem sendo aplicada na produção de medicamentos, sendo bem aceita como agente fitoterapêutico, como princípio ativo que auxilia na digestão, podendo substituir a pepsina e tripsina em tratamentos de insuficiência pancreática. Pode ser também usada na terapêutica de cardiopatias, artrite reumatóide, traumas cirúrgicos, edemas e sinusites; em terapias contra carcinomas, em função do aumento da lise celular, além de aumentar a ação de antibióticos se administrada concomitantemente (PIZA et al., 2002; BALA et al., 2012).

Aplicada no tratamento de verminoses, por exemplo, *Ascaris* e *Trichuris*; desbridamento de feridas, nas queimaduras principalmente nas de 3º grau; minimizar as dores menstruais, quando usada como solução de irrigação; bromelina também está envolvida na inibição da agregação plaquetária, sinusite, bronquite, traumas cirúrgicos, pielonefrite (FREIMAN; SABAA, 1999; MAURER, 2001); usada

como solução para preparação de suspensão de hemácias para tipagem sanguínea (CESAR, 2005). Recentemente bromelina foi relatada na melhora do microambiente de feridas causadas por armas de fogo (WU et al., 2012).

Além disso, assume também posição na indústria de alimentos no que diz respeito à produção de amaciantes de carnes, processos de panificação, de queijos, clarificação de cerveja, prevenção do escurecimento do suco de maçã, no preparo de alimentos infantis e dietéticos, de biscoitos a partir de farinha de trigo com alto teor protéico, produção de ovos desidratados, leite de soja, isolados proteicos. O FDA (*Food and Drug Administration*) qualificou bromelina como um aditivo alimentar sendo aceita com segurança (PIZA et al., 2002; TOCHI, 2008).

Mais ainda, a bromelina tem sido utilizada como ingrediente ativo para fornecer efeitos de *peeling* suave na indústria de cosméticos. Tem sido utilizada também na indústria do couro para tratamento, amolecimento e liberação de peptídeos antimicrobianos de proteínas insolúveis. Em indústrias têxteis, a bromelina é usada para melhorar as propriedades de tingimento de fibras proteicas, decompondo a fibra parcialmente (WALSH, 2002 citado por BALA et al., 2012; AEHLE, 2007; SALAMPESSY et al., 2010).

2.4.1 Indicações clínicas da bromelina

Evidência disponível indica que a atividade terapêutica da bromelina aumenta com as doses mais altas. Apesar de todos os seus mecanismos de ação ainda não estarem totalmente esclarecidos, foi demonstrado que é um seguro e efetivo suplemento (MATTOS, 2005, citado por CESAR, 2005).

Atividade fibrinolítica e efeito na coagulação sanguínea: efetiva *in vitro* e *in vivo*, porém, com efeito, mais evidenciado em soluções purificadas de fibrinogênio do que no plasma, provavelmente em função da presença de antiproteases no plasma. Observa-se que sua atividade está atribuída à conversão realçada de plasminogênio em plasmina, limitando o processo de coagulação em função da degradação de

fibrina. Uma concentração elevada de bromelina, prolonga o tempo de protrobina. (DE-GIULI, 1978, citado por KELLY, 1996; BHATTACHARYYA, 2008; PAVAN et al., 2012).

Atividade anti-inflamatória: tem sido utilizada na artrite reumatóide, lesões de tecidos moles, dor crônica e asma. O principal mecanismo de ação da bromelina parece estar relacionado à sua natureza proteolítica, apesar de algumas provas sugerirem propriedades imunomoduladoras agindo nas vias de sinalização intracelulares (TOCHI et al., 2008).

Atividade antineoplásica: Estudos recentes demonstraram que bromelina tem a capacidade de modificar as principais vias que suportam malignidade. A atividade anticancerígena de bromelina é devido ao seu impacto direto em células cancerosas e seu microambiente, bem como a modulação do sistema imunológico, inflamatório e hemostático (PAVAN et al., 2012). Após os tratamentos com doses relativamente altas durante várias semanas e meses, registraram-se notáveis remissões dos tumores malignos (MAURER, 2001). Outros estudos indicaram que a bromelina, combinada com agentes quimioterápicos, como 5-FU e a vincristina, tem resultados na regressão de tumores (THORNE RESEARSH, 1998).

Modulação da resposta imune: A bromelina tem sido recomendada como adjuvante terapêutico nas doenças auto-imunes (PAVAN et al., 2012). Promove indução de citocinas nas células mononucleares do sangue periférico humano. O tratamento leva a produção do fator alfa de necrose tumoral, interleucina-1 beta (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6) em um modelo tempo e dose-dependente. A indução de citocinas explica o efeito antitumor observado após a administração oral de um preparado polienzimático. A bromelina ainda remove células T CD44 moleculares dos linfócitos e afeta a ativação das células T, macrófagos e células *natural killer* (MAURER, 2001; PAVAN et al., 2012).

Desbridamento de feridas: utiliza agentes químicos que são seletivos para o tecido desvitalizado presente na ferida, causando danos mínimos em tecidos saudáveis. O uso tópico da bromelina, em creme com 35% do ativo em uma base lipídica, pode

beneficiar a eliminação de restos de queimadura e acelerar a cicatrização. (HOUCK, 1983, citado por TOCHI, et al., 2008).

Segundo Racine (2004) citado por Cesar (2005), as enzimas proteolíticas são aplicadas em formulações tópicas com a finalidade de reduzir a espessura da camada córnea da pele por hidrolisar, em pontos específicos, a queratina cutânea. É um *peeling* mais suave e seguro, comparado aos tradicionais *peelings* químicos, e mais eficazes que os métodos físicos comumente usados em formulações cosméticas.

Potenciação de antibióticos: constitui, em muitos países, a principal utilização da bromelina. Em humanos, sua atividade tem sido documentada pelo aumento da concentração de antibiótico na urina e no sangue (TAUSSING, 1988, citado por KELLY, 1996). Em terapias em que a bromelina é combinada com antibióticos, observou-se um aumento da efetividade desses antibióticos em vários quadros como, pneumonia, bronquite, infecções cutâneas por *Staphylococcus*, tromboflebites, celulite, pielonefrite, abscessos periretais e retais (NEUBAUER, 1960, citado por THOURNE RESEARSH, 1998), e sinusites (HUNTER et al., 1957, citados por KELLY, 1996). A bromelina é capaz de aumentar a efetividade principalmente de penicilinas e tetraciclina após a administração oral desses antibióticos (MAURER, 2001).

Propriedades mucolíticas: em um estudo clínico com 124 pacientes hospitalizados com bronquite crônica, pneumonia, broncopneumonia ou abscessos pulmonares, que administraram bromelina oralmente, houve uma diminuição do volume e purulência do volume pulmonar (SCHAFER, 1985, citado por THOURNE RESEARSH, 1998).

Esta propriedade se dá em função do efeito antiinflamatório e de ativação da circulação sanguínea e respiratória, já que suprimem os depósitos protéicos em veias e artérias (PIZA et al., 2002). Isso acontece quando as enzimas bromelina, ribonuclease, glicose oxidase, invertase e diastase presentes em *Ananas comosus*,

catalisam a quebra de ligações peptídicas, pela incorporação de moléculas de água, fluidificando o muco espesso (CESAR, 2005).

Ação digestiva: o uso da bromelina foi um sucesso, como enzima digestiva, após a pancreatômia, em casos de insuficiência exócrina do pâncreas, e em outras desordens intestinais (KNILL; JONES et al., 1970, citados por THOURNE RESEARSH, 1998; BHATTACHARYYA, 2008). Foi demonstrado também que a bromelina pode ser utilizada em substituição a pepsina e a tripsina em casos de deficiências dessas enzimas no organismo (WU et al., 2012).

A combinação de *ox bile*, pancreatina e bromelina é eficaz na digestão de gorduras em doentes pancreáticos com fezes estatorréicas, resultando num melhoramento sintomático da cólica intestinal, flatulência e frequência das evacuações (THOURNE RESEARSH, 1998).

Um estudo piloto que combinou bromelina, alginato de sódio, bicarbonato de sódio e alguns óleos essenciais, mostrou uma melhora significativa de sintomas dispépticos por um efeito sinérgico desses componentes (PELICANO et al., 2009).

O abacaxi e a bromelina purificada têm sido utilizados também na fabricação de balas para serem utilizados como auxiliares na digestão. Além da utilização do fruto *in natura* e assado em restaurantes no mundo inteiro (TOCHI et al., 2008; WU et al., 2012).

Ação Anti-diarréica: Evidências sugerem que a bromelina pode ser clinicamente útil na neutralização de alguns efeitos de certas enterotoxinas de patógenos intestinais como *Vibrio cholera* e *Escherichia coli* (PAVAN et al., 2012).

A bromelina parece impedir a secreção do fluído intestinal mediada por ativação de vias de sinalização, em ambos os patógenos. Além disso existem sugestões que a bromelina apresenta um efeito anti-adesão de *E. coli*, pois impede que o patógeno se ligue ao receptores de glicoproteínas específicos ao mudar proteoliticamente os seus sítios de ligação (MYNOTT et al., 1997; CHANDLER; MYNOTT, 1998).

Procedimentos cirúrgicos e ferimentos na musculatura esquelética: a bromelina é mais comumente utilizada no tratamento da inflamação dos ferimentos leves do tecido e promove redução clara de todos os parâmetros; inchaço, dor no descanso e durante o movimento (MASSON, 1995, citado por THOURNE RESEARSH, 1998). A administração numa pré-cirurgia pode reduzir o número médio de dias para o completo desaparecimento da dor e inflamação. Ensaio indicam que bromelina pode ser eficaz em reduzir o inchaço e hematomas. Bromelina é utilizada no tratamento da inflamação aguda e lesões esportivas (PAVAN et al., 2012).

Aplicação circulatória e cardiovascular: Bromelina tem sido eficaz no tratamento de doenças cardiovasculares, uma vez que é inibidora da agregação plaquetária, minimizando o risco de hipertensão arterial. Pesquisas indicaram que a bromelina minimiza a severidade de angina pectoris e do ataque sistêmico transiente. Uma combinação de bromelina com outros nutrientes podem proteger contra lesão isquêmica e reperfusão de músculo esquelético. Uma redução drástica na incidência de infarto após administração de orotato potássio e magnésio junto com 120-400 mg de bromelina/dia (NIEPER, 1978, citado por THOURNE RESEARSH, 1998). Tem sido utilizado na prevenção e tratamento da tromboflebite (PAVAN et al., 2012).

Osteoartrite: Uma combinação de bromelina, tripsina e rutina foi comparado com o tratamento com diclofenaco em 103 pacientes com osteoartrite do joelho. Após seis semanas, os dois tratamentos resultaram numa redução significativa e semelhante na dor e inflamação (PAVAN et al., 2012).

2.5 ESTRATEGIAS DE PURIFICAÇÃO DE BROMELINA

A produção em escala industrial depende de um conjunto de processos. A etapa de obtenção de um preparado de enzima inicia-se com extração da substância desejada. Segue-se o processo com as operações de separação e concentração da enzima de interesse (SANT'ANNA JÚNIOR, 2005).

Muitos processos biotecnológicos incluem as etapas de recuperação para a separação seletiva de uma proteína a partir de uma variedade de meios complexos, mas a baixa concentração e a semelhança entre as propriedades físico-químicas das proteínas em fazer a separação seletiva de uma molécula alvo é muito difícil e dispendioso. Assim novos processos biotecnológicos e estratégias *downstream processing* foram desenvolvidos para maximizar a recuperação de proteínas a partir de extratos vegetais brutos, tornando o processo economicamente viável (COELHO et al., 2013).

O processo de separação e purificação de bioprodutos, é um segmento muito importante na indústria biotecnológica, representando 80 a 90% do custo de produção (BELTER et al., 1988 citados por SARTORELO, 2004). O desenvolvimento de técnicas de purificação de proteínas tem sido pré-requisito essencial para muitos dos avanços na biotecnologia. De uma forma geral, a purificação desejada depende do número de etapas empregadas no processo e do uso a que se refere o produto final. A chave para o sucesso e eficiente purificação da proteína é selecionar a técnica mais adequada, otimizar o seu desempenho para atender as exigências e combiná-las em uma forma lógica a maximizar a produtividade e reduzir o número de passos necessários. Considerações como custos de material, tempo de trabalho e exeqüibilidade do processo são importantes em termos de economia (AMERSHAM, 1999; NETO, 2005).

Como resultado desta grande variedade de aplicações da bromelina, existe uma grande demanda desta enzima. Assim, a enzima comercial purificada não é tão barata custando até 2.400 dólares por quilo (KETNAWA et al., 2012). Isto levou ao desenvolvimento de várias estratégias de purificação para reduzir o custo de obtenção da bromelina do caule (BALA et al., 2012).

Os processos convencionais utilizados na extração e purificação de bromelina são muitas vezes bem trabalhosos, e frequentemente resultam em baixos rendimentos de enzima. Assim, novas técnicas de purificação são altamente necessárias para aumentar o rendimento global da atividade da enzima e ao mesmo tempo diminuir o número de passos envolvidos na purificação de bromelina (BALA et al., 2012).

Algumas novas estratégias de purificação foram recentemente empregadas e desenvolvidas para a extração e purificação de bromelina. Dentre elas estão: a extração líquido-líquido em sistema de duas fases aquosas (BABU et al., 2008 ; KETNAWA, 2010; KETNAWA et al., 2011a ; KETNAWA et al. , 2011b; COELHO et al., 2013) , Sistema de micelas reversas (HEBBAR et al., 2008 ; KUMAR et al., 2011; HEBBAR et al., 2011), separação por membranas filtrantes (DOKO et al., 2005) precipitação (DOKO et al., 2005 ; GAUTAM, et al., 2010 ; COSTA, 2010; SILVESTRE et al., 2012) e diferentes técnicas cromatográficas (DEVAKATE et al., 2009; GAUTAM et al., 2010; YIN et al., 2011; COSTA; FERNANDES; VENTURA, 2012). Essas estratégias incluem a utilização dessas técnicas ou a associação delas (COSTA, 2010)(Figura 4).

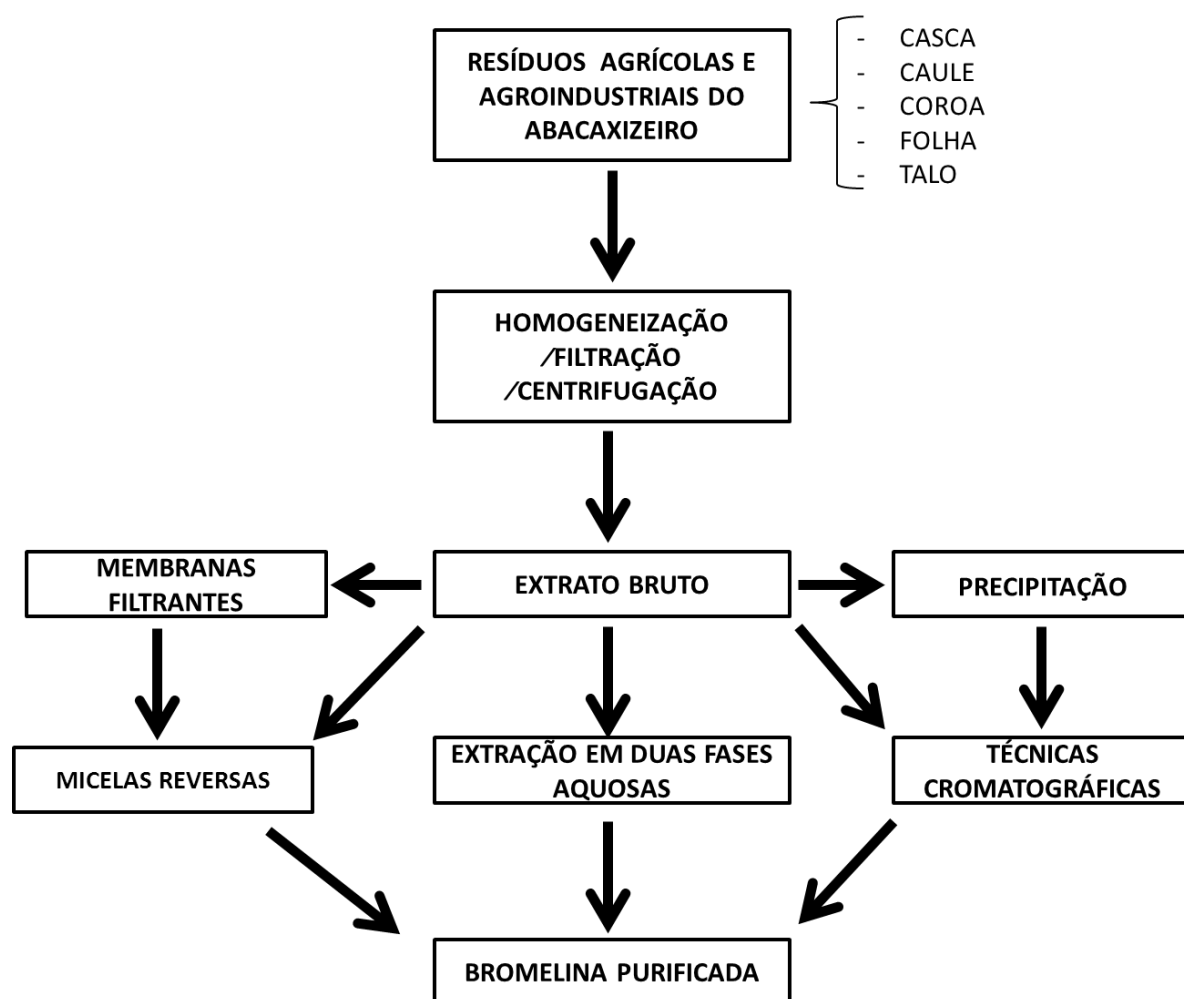


Figura 4 – Representação esquemática das estratégias de purificação de bromelina
 Fonte: Adaptado e modificado de Bala et al. (2012)

2.5.1 Extração líquido-líquido em sistema de duas fases aquosas

Em 1956, o holandês Beijerinck observou a separação de duas fases aquosas após misturar gelatina (ou amido) e ágar. Neste mesmo ano, Albertsson observou que, através deste sistema, era possível que da adição de material biológico, este fosse coletado em uma das fases por ajuste de parâmetros físico-químicos (CESAR, 2000).

A extração em duas fases aquosas é um eficiente método para separação e mistura de proteínas ou enzimas. Pode remover subprodutos indesejáveis presentes no sistema, tais como, polissacarídeos não identificados, proteínas e pigmentos que interferem ou reduzem a atividade das enzimas (NADZIRAH et al., 2013).

Dentre as vantagens de se aplicar um sistema de duas fases aquosas destacam-se o elevado rendimento; a faixa de trabalho próximo ao equilíbrio; fácil ampliação de escala; processamento contínuo; baixo custo do processamento; possibilidade de evitar a degradação de compostos e conseqüentemente à desnaturação de proteínas que pode ser causada com uso de energia térmica usada por processos de separação; aumento da seletividade da extração, além do emprego de compostos pouco voláteis e em pequena quantidade; e possibilidade de pesquisa de novos compostos formadores de fases, especialmente para substituir o polímero dextrana que possui elevado custo (CAMPESE, 2004).

Para um melhor entendimento do sistema bifásico aquoso, vários autores propõem modelos e teorias que expliquem essa formação de fases tentando prever a curva binodal dos sistemas polímero-sal e polímero-polímero. Entretanto, a existência de inúmeros modelos ocasiona ao pouco entendimento das misturas líquido-líquido, não determinando uma boa compreensão da melhor teoria a ser utilizada (CESAR, 2000; COELHO, 2013).

Para um sistema polímero-polímero, a teoria de Flory-Huggins é a mais utilizada, chegando a oferecer uma ótima aproximação da curva binodal. Constitui-se basicamente de um estudo estatístico de como as moléculas e macromoléculas podem se distribuir e redistribuir até que possuam arranjos e configurações que

possam ser estudados. Outra teoria também utilizada é a do volume excluído, em que com argumentos estatísticos e geométricos determina-se a concentração de cada polímero em cada fase através da quantidade de moléculas que é ajustada no volume da fase (CESAR, 2000).

Para um sistema polímero-sal, a teoria mais aplicável é o modelo de Ptizer, em que se combinam parâmetros eletrostáticos com a interação entre as moléculas do soluto, simplificando os mecanismos estatísticos. Pela teoria de Debye-Huckel, leva-se em consideração a distribuição dos íons na solução para o cálculo de potencial químico, entretanto à medida que a concentração iônica aumenta, o desvio entre os resultados teóricos e empíricos também aumentam, em função de ser usado apenas em soluções diluídas, onde o comportamento eletrostático domina. Pode também ser aplicável para polímero-polímero com sais (CABEZAS JÚNIOR, 1996, citado por CESAR, 2000).

As maiorias dos polímeros hidrofílicos, naturais ou sintéticos miscíveis com água, mostram separação de fase em uma mistura com um segundo polímero ou com sais. A composição das fases e a concentração das misturas para que ocorra a separação de fases, podem ser representadas através de um diagrama genérico de fases (CESAR, 2005).

A Figura 5 representa as concentrações para um sistema expressas em porcentagem (p/p), em que a curva que separa a região em duas áreas distintas é chamada de curva binodal ou curva de equilíbrio. A região acima (B) é bifásica e abaixo (A) monofásica (CESAR, 2000; CABRAL et al., 1993, citados por CAMPESE, 2004; CESAR, 2005).

A composição inicial do sistema é representada por M e, a composição final após atingir o equilíbrio, de cada fase, está representada por T (fase superior ou de topo) e F (fase inferior ou de fundo). A linha TMF é conhecida como linha de amarração e todos os sistemas cuja composição inicial está contida nesta linha possuem a mesma composição de fases após o equilíbrio, porém com diferentes razões de volume entre as fases superior e inferior. Já a linha de amarração determinada pelo ponto N, define uma nova linha que aumentou proporcionalmente a concentração das fases em relação à linha de amarração determinada por M. Esta variação de

pontos, do M para o N, segundo Cesar (2000), não se obtém melhora significativa na recuperação e purificação de proteínas. Já Campese (2004), considera que o comprimento das linhas de amarração é responsável por muitos efeitos envolvidos na partição dos componentes e prevê que o coeficiente de partição aumenta à medida que aumenta a diferença da composição das fases. Ou seja, o aumento da linha de amarração promove alteração da partição das proteínas (CARLSON, 1988, citado por CAMPESE, 2004). Diferentemente de Cesar (2000), Campese (2004) se baseia na teoria de Flory-Huggins, utilizada apenas para sistema polímero-polímero e não polímero-sal, como aborda Cesar (2000) em seu trabalho.

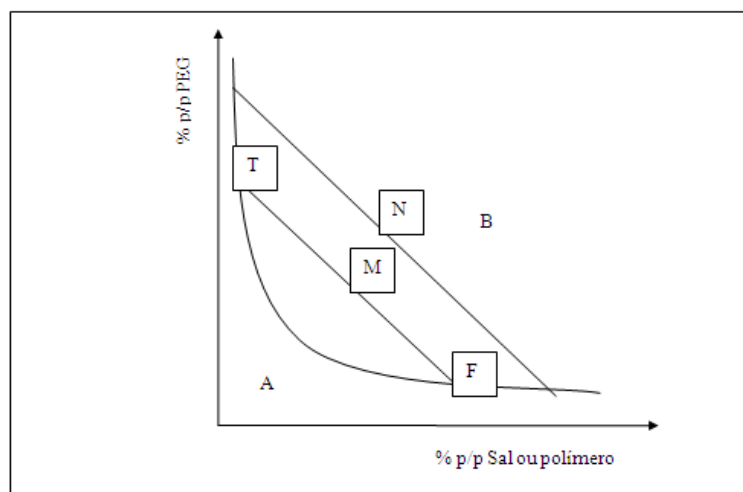


Figura 5 -Diagrama de fases genérico representando a curva binodal, linha de amarração (eixo TMF) no ponto M e N e os sistemas monofásico (A) e bifásico (B) em um sistema PEG/Sal ou polímero. Fonte: Cesar (2000); Campese (2004).

O diagrama de fases de um determinado sistema pode ser influenciado por fatores como massa molecular do polímero, concentração dos componentes do sistema, temperatura, adição de sais, e pH (KULA et al., 1982, citados por CAMPESE, 2004; CESAR, 2000; CESAR, 2005).

No que se refere à massa molecular dos polímeros, quando a mesma é aumentada, a separação das fases será obtida com concentrações mais baixas de polímeros. Haverá um deslocamento da binodal no sentido da região monofásica em função do aumento do massa molecular do polímero e as fases apresentam maior quantidade de água. Quanto maior for a diferença entre as massas molares dos polímeros, mais assimétrica será a binodal (FORCINITI, 1991; ALBERTSSON et al., 1994, citados por CESAR, 2000) e maior o comprimento da linha de amarração.

O efeito da temperatura altera a composição das fases no equilíbrio, deslocando a curva binodal e modificando o comprimento da linha de amarração. Este efeito é diferente de sistema para sistema, mas em geral o comprimento da linha diminui com aumento da temperatura (CESAR, 2000; CAMPESE, 2004).

O efeito da adição de sais altera o diagrama de fases em função do tipo de sal adicionado, e com o sistema bifásico aquoso. O aumento da concentração de sais monovalentes ($>0,1M$) em sistema polímero-polímero altera a composição das fases sem provocar alterações significativas da binodal. Entretanto, sais multivalentes possuem a preferência pela fase inferior, alterando a composição das fases e deslocando a binodal e, quando os polímeros são carregados, a separação de fases é bastante dependente da composição iônica. Quanto à adição de sais a sistemas constituídos por polímero-sal, tem-se que quanto maior for a carga do ânion, mais baixa a concentração de sal necessária para que ocorra a separação das fases (CESAR, 2000).

Numa alteração de pH, observa-se em pesquisas com polímero-sal, que seu aumento tende a levar a menores concentrações de polímero e sal (CESAR, 2000).

Além destes fatores, devem-se considerar as propriedades físicas das fases como a tensão interfacial, viscosidade, pressão osmótica e tempo.

A tensão interfacial entre as fases é muito pequena, o que contribui para a formação rápida de fases e minimização da desnaturação de biomoléculas que condensam na interface, preservando sua atividade biológica. Diante do aumento da concentração do polímero, entretanto, há aumento da tensão superficial (ALBERTSSON, 1986, citado por CAMPESE, 2004).

A viscosidade é diretamente proporcional à massa do polímero, ou seja, quanto maior a massa molar desse polímero, mais elevada a viscosidade das duas fases em equilíbrio (ALBERTSSON, 1986, citado por CAMPESE, 2004). Esse aumento pode ser minimizado com uso de concentrações mais baixas destes polímeros para a formação das fases. Desta forma, a viscosidade é extremamente dependente das concentrações (TJERNELD; JOHANSSON, 1990; CABRAL et al., 1993, citados por CAMPESE, 2004).

Já a pressão osmótica das fases é pequena quando se tem elevadas massas molares dos polímeros formadores de fases. Quando as fases estão em equilíbrio, essa pressão é a mesma para ambas, mas em elevadas concentrações dos polímeros, a pressão osmótica é independente da massa molar (ALBERTSSON, 1986, citado por CAMPESE, 2004).

E, por fim, o tempo de separação das fases após a mistura dos componentes depende do tipo de sistema em que se encontram, onde uma maior densidade e viscosidade produzem separação mais lenta. Deve-se ainda considerar que quando se agita um sistema de maneira a uniformizá-lo, inicialmente ocorre formação de pequenas bolhas ricas em cada componente que, com o tempo aumentam-se e ocorre a separação em regiões distintas. Este tempo de coalescência é dependente do tempo necessário para a separação das fases (ALBERTSSON, 1986, citado por CAMPESE, 2004).

Em sistemas próximos ao ponto crítico, o tempo de separação é maior a uma pequena diferença de densidade, assim como nos pontos mais afastados onde a viscosidade é alta devido ao aumento da concentração dos polímeros, requerem-se tempos longos de separação. De maneira geral, as propriedades físicas dos sistemas bifásicos aquosos podem ser alteradas por manipulação de sua concentração e composição dos polímeros e sais (ALBERTSSON, 1986, citado por CAMPESE, 2004).

Existem vários sistemas de duas fases aquosas que podem ser divididos em quatro grupos:

1. Dois polímeros não-iônicos

- PEG/ficoll, PEG/dextrana, PEG/polivinil álcool, polipropilenoglicol/dextrana, metilcelulose/hidroxipropildextrana, ficoll/dextrana;

2. Um polieletrólito e um polímero não iônico

- Sulfato de dextrana de sódio/polipropilenoglicol, carboximetildextrana de sódio/PEG, carboxometilcelulose de sódio/metilcelulose;

3. Dois polieletrólitos

- Sulfato de dextrana de sódio/carboximetildextrana de sódio, carboximetildextrana de sódio/carboximetilcelulose de sódio;

4. Um polímero não-iônico e um composto de baixa massa molecular

- Propilenoglicol/fosfato de potássio, PEG/fosfato de potássio, metoxipolietilenoglicol/fosfato de potássio, polipropilenoglicol/glicose, PEG/glicose, PEG/sulfato de magnésio, PEG/citrato de sódio; PEG $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (CESAR, 2000; COELHO et al., 2013).

Ao final de uma partição bifásica aquosa, deve-se considerar a purificação das moléculas biológicas presentes e a reutilização dos polímeros constituintes. A modelagem quantitativa da partição de proteínas nestes sistemas representa um complexo problema, pelo fato do comportamento do sistema depender de vários fatores, tais como, tamanho da molécula, conformação, estrutura da superfície, interações de polímeros com as cadeias de proteínas e com diferentes sais, interações polímero-polímero, sal-proteína, proteína-proteína e, quando usados, as interações dos ligantes com os outros componentes presentes no sistema. Estudos experimentais com SBA (Sistemas bifásicos aquosos) mostraram que a distribuição da proteína se dá em função de diversos fatores (BASKIR et al., 1989, citados por CESAR, 2000):

- Tipo dos polímeros que formam as fases: peso médio, distribuição do massa molecular, modificações químicas poliméricas;
- Composição das fases: comprimento da linha de amarração, tipo de íons presentes ou adição ao sistema, força iônica;
- Biomolécula: tamanho, carga, propriedades superficiais, concentração;
- pH e temperatura.

As condições adequadas para a partição de proteínas devem ser encontradas experimentalmente devido à interdependência dos fatores citados anteriormente, verificando-se a influência de cada um e a interação entre as variáveis no

comportamento do sistema. Diante deste comportamento, dependendo do sistema constituinte das fases, a proteína pode ser purificada da fase PEG ou da fase do polímero ou sal (BASKIR et al., 1989, citados por CESAR, 2000).

Nos processos biotecnológicos em que se utilizam biomoléculas ou células, existe um número limitado de solventes adequados para a separação de biomoléculas devido às suas características de superfície molecular, que faz com que essas moléculas fiquem suscetíveis à desnaturação na presença de solventes orgânicos.

A constituição das fases, em torno de 70 a 90% de água, proporciona ambiente ameno para os compostos biologicamente ativos, pois não preservam sua estabilidade molecular (CESAR, 2000; NADZIRAH et al., 2013).

O sistema bifásico de fases aquosas foi utilizado para separação e purificação de uma mistura de bromelina e polifenoloxidase do abacaxi. A técnica rendeu um valor 4 de fator de purificação da bromelina (BABU et al., 2008).

Ketnawa et al. (2010) apresentaram um processo que purifica bromelina a partir da casca de abacaxi, rendendo 2,23 de fator de purificação. Em 2011 o mesmo grupo purifica com 3,44 de fator de purificação, utilizando água destilada contendo cisteína e EDTA, e tampão fosfato pH 7.

Campese (2004) buscando uma nova alternativa para o sistema bifásico aquoso, utiliza a extração e recuperação da bromelina com o sistema PEG/Policaju (POLICAJU -. exsudado do cajueiro, heteropolissacarídeo ramificado) e recupera uma a enzima com apenas 68,82% de atividade.

Coelho et al. (2013), utilizaram um método não-convencional utilizando o sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como sal na região inferior para purificar a bromelina, apresentando um valor máximo de 11,80 de fator de purificação.

Os sistemas bifásicos PEG-Sais apresentam, no entanto, alguns problemas que limitam sua aplicabilidade. Estes sistemas formam-se com elevadas concentrações de sal em ambas as fases, o que pode causar a desnaturação de estruturas biológicas. Estes sistemas apresentam ainda o inconveniente de adicionarem elevadas concentrações de fosfatos e sulfatos aos efluentes industriais, ao se

pensar em uma produção em larga escala, gerando uma preocupação ambiental (CAMPESE, 2004; PORTO et al., 2008; NADZIRAH et al., 2013).

2.5.2 Sistemas de micelas reversas

A extração líquido-líquido por micela reversa veio para suprir as necessidades da extração por duas fases aquosas, através de sua capacidade de solubilizar biomoléculas específicas de uma solução aquosa, sendo apontada como uma ferramenta útil e versátil para a recuperação destas, especialmente das proteínas (BORRACINI, 2006; BALA et al., 2012).

O sistema de micelas reversas é uma técnica de extração líquido-líquido promissora para a purificação de biomoléculas a partir de soluções diluídas (BALA et al., 2012). Dentre as vantagens da utilização dessa estratégia, estão a operação simples e a preparação contínua.

Esta técnica baseia-se na propriedade que os agentes tensoativos (moléculas que possuem em sua estrutura uma extremidade hidrofóbica e outra hidrofílica) têm de auto organizar-se quando em solução, em presença de água, na forma de estruturas esféricas ou elipsoidais, que são chamadas de micelas (BORRACINI, 2006).

Os agentes tensoativos são formados por moléculas de surfactantes que têm na mesma molécula uma porção hidrofílica ou polar, denominada cabeça, e uma porção hidrofóbica ou apolar, a qual é referida como cauda (SHIPOVSKOV et al., 2005, citados por BORRACINI, 2006).

Em um meio apolar, as micelas apresentam sua orientação inversa em relação à formação da estrutura micelar em água, assim, obtêm-se a chamada micela reversa; aglomerados moleculares elipsoidais ou esféricos, cujo núcleo por suas características hidrofílicas pode em determinadas condições reter água, a qual fica parcialmente protegida do contato com o solvente orgânico pelo agregado de moléculas de surfactante (LUISE et al., 1988; MEYER, 1992; JOLIVALT et al., 1993; BRANDINI et al., 1994, citados por BORRACINI, 2006).

A micela reversa é composta por três regiões, sendo que a primeira é formada pela cauda hidrofóbica do tensoativo, que fica em contato direto com o solvente apolar; a segunda é a periferia micelar onde as moléculas de água estão fortemente ligadas aos núcleos polares das moléculas do tensoativo; e a terceira é o centro micelar, formado pela água contida no interior da micela que está ligada ao tensoativo ou água livre (AIRES; BARROS; CABRAL, 1991, citados por BORRACINI, 2006).

A auto-organização do surfactante em sistemas micelares para a purificação de proteínas depende basicamente do equilíbrio em um sistema ternário constituído pelo solvente orgânico, água e surfactante; variando-os de maneira a atingir-se a concentração micelar crítica, ou seja, a faixa de concentrações onde ocorre a formação de micelas (SEOUD et al., 1999, citados por BORRACINI, 2006).

O mecanismo de formação de micelas reversas não está totalmente elucidado. No entanto, a teoria mais aceita descreve a formação da mesma como um mecanismo cooperativo entre proteína e tensoativo: a interface entre as duas fases (aquosa e micelar) se deforma em torno da proteína, formando a micela e transferindo-a para a fase orgânica (DUNGAN et al., 1991, citados por BORRACINI, 2006).

Quanto ao surfactante para sistemas micelares, é importante a classificação de acordo com a carga de sua porção hidrofílica em: catiônico, aniônico, neutro e anfótero (GOTO et al., 1997, citados por BORRACINI, 2006). A escolha de qual surfactante que será melhor aplicado ao processo de separação dependerá de características da proteína e do sistema em si. Deve-se levar em conta o valor do ponto isoelétrico das mesmas e o tamanho da micela desejada (BORRACINI, 2006).

O ponto isoelétrico (pI) da proteína é quem definirá a escolha do tipo de surfactante para sistemas micelares, se aniônico ou catiônico. Ao trabalhar com a proteína em valores de pH abaixo do seu pI, a mesma apresentará distribuição de estado de ionização dos resíduos positivo; portanto para uma melhor transferência de massa preferencialmente escolheria-se um tensoativo aniônico. Para o caso contrário, ou seja, o pH do sistema acima do pI, o valor da distribuição de cargas na molécula de proteína seria negativa, portanto o surfactante preferencialmente escolhido para a promoção de transferência entre as fases seria o catiônico (MEYER, 1992, citado

por BORRACINI, 2006). A concentração do tensoativo também interfere na formação micelar (BORRACINI, 2006).

Na escolha do solvente deve-se levar em consideração que o mesmo seja imiscível em água, entre os solventes orgânicos utilizados como meio dispersivo na formação de micelas, destacam-se os hidrocarbonetos alifáticos, como o n-octano, isooctano, porém para os aromáticos como o benzeno e o xileno e os halogenados como o clorofórmio, também podem ser utilizados (LUIZI; MAGID, 1986; LUIZI et al., 1988; YANG; ROBB, 2005; PACHECO et al., 2005, citados por BORRACINI, 2006).

Há muitos relatos na literatura utilizando o sistema de micelas reversas para extração e purificação de bromelina. Hebbar et al (2008) extraíram bromelina a partir dos resíduos de abacaxi e do talo rendendo um fator de purificação de 5,2. Há relatos também da purificação de bromelina a partir do suco do abacaxi (HEMAVATHI et al., 2007), e rendeu um fator de purificação de 4,54 (BALA et al., 2012).

2.5.3 Separação por membranas filtrantes

A técnica de separação por membranas é representada principalmente pela osmose inversa (OI), nanofiltração (NF), ultrafiltração (UF) e microfiltração (MF). Uma das vantagens deste processo é que não se utilizam compostos químicos. É uma técnica que têm sido utilizadas nos mais diversos setores industriais em função do baixo consumo de energia, redução do número de etapas em um processamento, maior eficiência na separação e alta qualidade do produto final (PETRUS, 1997 citado por JULIANO, 2004).

Os processos com membranas incluem várias técnicas, nas quais a pressão é utilizada para passar o efluente sobre uma membrana semi-permeável. Essa membrana permite que o solvente atravesse, mas impede a passagem das substâncias solúveis que estão contidas na solução. Dentre os processos com membranas, pode-se mencionar; nanofiltração, microfiltração, ultrafiltração, osmose inversa, diálise, eletrodialise, pervaporação (JULIANO, 2004) (Tabela 3).

Tabela 4 - Processos de separação de membranas e suas aplicações

| Processos | Força Motriz | Material Retido | Material que permeia | Aplicações |
|---------------------|--------------------------------------|--|--|---|
| Microfiltração (MF) | Diferencial de pressão (0,5 - 2 atm) | Material em suspensão, bactérias. Massa molecular >> 500.000 Da | Água e sais dissolvidos | * Esterilização * Clarificação de vinhos e cervejas * Concentração de células |
| Ultrafiltração UF) | Diferencial de pressão (1 - 7 atm) | Colóides, macromoléculas. Massa molecular > 5.000 Da | Água, sais solúveis de baixa massa molar, açúcares | * Fracionamento e concentração de proteínas * Clarificação de bebidas * Recuperação de pigmentos e óleos |
| Nanofiltração (NF) | Diferencial de pressão (5 - 25 atm) | Moléculas de massa molecular entre 500 e 2.000 Da | Água, sais e moléculas de baixa massa molar | * Purificação de enzimas * Recuperação de corantes de efluentes da indústria têxtil * Concentração de lactose e outros açúcares |
| Osmose inversa (OI) | Diferencial de pressão (15 - 80 atm) | Todo material solúvel ou em suspensão | Água | * Dessalinização de águas * Concentração de suco de frutas * Desalcoolização de bebidas * Desmineralização de águas |
| Diálise (D) | Diferencial de concentração | Moléculas de massa molar maior que 5.000 Da | Íons e orgânicos de baixa massa molar | * Hemodiálise * Recuperação de NaOH |
| Eletrodiálise (ED) | Diferencial de potencial elétrico | Macromoléculas e compostos não iônicos | Íons | * Concentração de soluções salinas * Purificação de águas |
| Pervaporação (PV) | Pressão de vapor | Líquido menos permeável | Líquido mais permeável | * Desidratação de álcoois * Concentração de aromas |

Fonte: Juliano (2004).

A viabilidade em escala industrial deste processo de separação por membranas depende, dentre outros fatores, da escolha adequada da membrana para o processamento de um determinado produto, inclusive que a membrana tenha alto fluxo, retenção desejada, altas resistências química, mecânica e térmica, e vida útil relativamente longa. O elevado custo destes processos em nível industrial deve-se principalmente ao preço das membranas e, em alguns casos, à necessidade de freqüente substituição destas (LAWRENCE et al., 1997, citados por JULIANO, 2004).

O uso de microfiltração e ultrafiltração tem sido amplamente empregado na separação de biomoléculas com interesse industrial. Existem vários trabalhos que utilizam a tecnologia de separação de membranas para purificação de bromelina (BALA et al., 2012).

Doko et al. (2005) reportaram o uso para purificação de bromelina. A bromelina purificada foi obtida utilizando uma sequência em batelada que envolvia microfiltração, ultrafiltração seguida por extração com sulfato de amônio. Os resultados obtidos mostraram 50% de recuperação com 98% de proteína.

Outros trabalhos mostram a purificação de bromelina da polpa do abacaxi combinando a microfiltração e ultrafiltração, apresentando 85% de atividade de bromelina recuperada (LOPES et al., 2009). Também há relatos na literatura utilizando membrana de adsorção com óxido de titânio e ultrafiltração apresentando 5,3 de fator de purificação (CHAO et al., 2009 citado por BALA et al., 2012).

2.5.4 Precipitação

A separação de proteínas de meios aquosos por precipitação é um dos métodos mais tradicionais para a recuperação e purificação parcial dessas biomoléculas. Este método implica na alteração da estrutura tridimensional da proteína, desconformando-a, por isso aplicado somente quando a ressolubilização do precipitado é possível. Os precipitados de proteínas são agregados de moléculas protéicas, grandes o suficiente para serem decantados ou centrifugados (CESAR, 2005).

A solubilidade das proteínas depende da distribuição de grupos ionizáveis, zonas hidrofóbicas e hidrofílicas na superfície da molécula. Tais características são responsáveis por interações polares com o solvente aquoso, interações iônicas com os sais presentes no meio, além da repulsão eletrostática entre moléculas de mesma carga. A presença de solventes orgânicos, pH, sais ou polímeros são fatores importantes na solubilidade das proteínas, podendo induzir a precipitação se houver mudança em um desses fatores (SCOPES, 1994, citado por SARTORELLO, 2004).

A adição de solventes orgânicos miscíveis em água tais como etanol, metanol ou acetona a um meio aquoso contendo proteínas causa uma variedade de efeitos, os quais, combinados provoca a precipitação da proteína. O tamanho da molécula é importante, e geralmente as de maior massa molecular são precipitadas em menores concentrações de solvente (NETO, 2005).

O solvente destrói a camada de hidratação hidrofóbica em torno das zonas hidrófobas e passa a circundar tais regiões devido à maior solubilidade destas em meio ao solvente. Com isso, as regiões carregadas com carga positiva ou negativa da superfície da proteína podem interagir, atraindo-se umas às outras, formando agregados. As interações do solvente com as zonas hidrófobas internas causam uma desconformação irreversível da proteína (CESAR, 2005).

Para evitar a desnaturação o solvente deve ser usado resfriado adicionado lentamente sob agitação, ou seja, o processo deve ser efetuado em baixas temperaturas da ordem de zero ou abaixo, pois nestas condições a flexibilidade da molécula é menor, reduzindo a capacidade de penetração do solvente e a desnaturação irreversível das proteínas, sendo que, os álcoois de cadeia mais longa apresentam maior efeito desnaturante do que os de cadeia mais curta (SCOPES, 1994, citado por CESAR, 2005).

Uma carga global próxima a zero na superfície da proteína, o que acontece no ponto isoelétrico das proteínas (pI), minimiza a repulsão eletrostática podendo causar precipitação por interação entre as zonas hidrofóbicas, e esse processo chama-se precipitação isoelétrica, e é realizado apenas com a correção do pH, assim, a precipitação ocorrerá em concentrações mais baixas de solventes. De modo geral, a

precipitação por qualquer método escolhido é facilitada no ponto isoelétrico da proteína (CESAR, 2005).

A precipitação com 80% v/v de etanol, a 5°C e no pH original da amostra é uma forma adequada para a recuperação da bromelina presente no fruto do abacaxi com rendimento de cerca de 100%. A vantagem de utilização do etanol como agente de precipitação encontra-se na abundância e baixo custo deste solvente, tornando a recuperação da enzima economicamente interessante. O etanol pode ser reciclado ao processo por operação de destilação, reduzindo impactos ambientais pela liberação de efluentes. As desvantagens do seu uso são: a necessidade de operação a baixa temperatura para minimizar a desnaturação da enzima e o perigo de inflamabilidade deste solvente (SANTOS, 2006). Sant'Anna Júnior (2005) relatou que apesar de muitos trabalhos optarem pelo etanol, a acetona é precipitante mais conveniente na preparação industrial de bromelina, pois utiliza-se um volume de acetona para quatro volumes de etanol. E, assim como o etanol, pode ser recuperada destilando-se o sobrenadante resultante da centrifugação.

A adição de sais neutros e ácidos, principalmente $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ a elevadas concentrações 1,5 a 3,0 M, reduz a disponibilidade da água devido à hidratação dos íons, criando condições para a precipitação, a qual ocorre principalmente por interação das zonas hidrófobas. O sal e outros precipitantes não provocam a precipitação de todas as proteínas, pois o seu efeito é o de reduzir a solubilidade. Com isso, a concentração de sal ou solvente que provoca a precipitação varia com a concentração da proteína e a presença de outras proteínas contaminantes. Este fato é aproveitado para a realização de um fracionamento (CESAR, 2005).

A adição de sais como NaCl ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ aumenta a força iônica, de tal forma que as moléculas protéicas se agregam e precipitam. O sal é adicionado ao sobrenadante até uma porcentagem de saturação em que a enzima de interesse é precipitada e obtida por centrifugação, a qual deve ser realizada a frio e mantida a 0° C. A composição do extrato pode influenciar a precipitação, assim como sua concentração e a temperatura. A adição do sal deve ser lenta e sob agitação para favorecer a homogeneização; a adição na forma de pó tem a vantagem de não aumentar muito o volume do sobrenadante, evitando problemas de centrifugação.

Após a centrifugação, o sedimentado (“pellet”) pode ser redissolvido em tampão adequado, utilizando-se um volume de aproximadamente duas vezes o volume do “pellet”, o solvente presente no mesmo, ao final do processo, pode ser retirado por evaporação ou tratamento sob vácuo, preferencialmente a 4°C. Como a concentração de sulfato de amônio nesse ponto ainda é alta pode ser necessária uma dessalinização para a medida de atividade e também para procedimentos posteriores de purificação (NETO, 2005).

A precipitação com sulfato de amônio têm sido amplamente empregada para precipitar proteínas de uma forma parcial. O sulfato de amônio é o mais empregado por ser considerado de baixo custo e suficientemente solúvel (BALA et al., 2012).

Devakate et al (2009) ao purificarem bromelina do fruto do abacaxizeiro encontram um fator de 2,81 de purificação na fração de 40-60%.

Também foram encontrados valores elevados (98%) em atividade de bromelina purificada parcialmente a partir do caule do abacaxizeiro na fração 50-75% de saturação. Na comparação com a precipitação por acetona, a bromelina do caule manteve os valores mais elevados de atividade quando precipitada com sulfato de amônio (82 e 98% respectivamente) (COSTA, 2010).

2.5.5 Técnicas Cromatográficas

As técnicas cromatográficas têm sido amplamente e continuamente utilizadas com sucesso em desenvolvimento de metodologias de separação e purificação de bromelina do abacaxi. Dentre as técnicas utilizadas na purificação merecem destaque a cromatografia por troca iônica cromatografia por exclusão molecular; e entre a menos utilizada está a cromatografia por afinidade (BABU et al., 2008; BALA et al., 2012).

Os métodos cromatográficos são os procedimentos de separação e isolamento que podem ser usados para fins de identificação e análise de misturas e substâncias isoladamente, chamadas de cromatografia analítica e, usadas para isolamento de compostos, neste caso cromatografia preparativa. A fase estacionária é formada por

partículas esféricas de material insolúvel e pode estar numa coluna aberta ou fechada, ou ainda constituir uma superfície plana, como na cromatografia em papel e camada delgada (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2004).

As enzimas que possuem maior atração pela fase estacionária irão fixar e mover-se lentamente daquelas que têm maior afinidade pela fase móvel. A fase estacionária é chamada de matriz ou resina que pode ser modificada pela ligação de grupos químicos para conferir-lhe determinadas características físico-químicas adquiridas a cada processo. As matrizes mais comuns são polímeros como celulose, dextrana, agarose, poliacrilamida e poliestireno, e devem possuir alta estabilidade química, mecânica e biológica (NETO, 2005). Em geral, a técnica envolve a montagem da coluna ou placa, aplicação da amostra, desenvolvimento, revelação, visualização e extração da substância retida (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2004).

Para isolamento e separação da bromelina do caule e do fruto tem sido utilizada a cromatografia de troca iônica que se baseia na adsorção reversível de moléculas do soluto carregadas a grupos iônicos de cargas opostas ligadas covalentemente a um suporte. Esta técnica de purificação de proteínas depende basicamente de quatro passos, como equilíbrio da resina em pH e condutividade, adsorção das proteínas pela resina, eluição destas proteínas e regeneração da resina (CABRAL, 2005; COSTA 2010).

As enzimas carregam grupos ionizados em sua superfície em função principalmente dos resíduos de aminoácidos, em que as cargas positivas são devidas aos resíduos de histidina, lisina, arginina e amina N-terminal e, as cargas negativas, devido aos ácidos aspártico e glutâmico e ao grupo carboxi-terminal. O balanço das cargas depende da quantidade desses grupos e isso varia com o pH (NETO, 2005).

O ajuste do pH deve facilitar a adsorção da enzima, porém não de modo a dificultar a eluição, como ocorre quando se tem uma diferença maior no pH levando uma ligação entre enzima e resina. A eluição torna-se mais eficaz quando se utiliza um gradiente linear em que o pH ou a força iônica sofre uma mudança contínua, entretanto são pouco utilizados em relação à força iônica, pois existe pouca reprodutibilidade e é dificilmente produzido em função das mudanças de pH para uma força iônica constante (NETO, 2005).

As proteínas são anfifílicas e possuem tanto carga líquida positiva quanto negativa, dependendo do pH do meio e do seu ponto isoelétrico (pI). Portanto, para sua purificação pode ser utilizado tanto trocador aniônico quanto catiônico. A escolha do trocador iônico dependerá da estabilidade da proteína em função do pH a ser utilizado. Na seleção da resina para purificação de enzimas, o pH de estabilidade deve ser considerado para que se trabalhe numa faixa adequada. Se a enzima é estável acima do pI, uma resina trocadora aniônica deverá ser escolhida, assim como abaixo do pI, uma resina trocadora catiônica será escolhida (NETO, 2005; PESSOA JUNIOR; KILIKIAN, 2005).

Na cromatografia de troca iônica, a de troca catiônica é a metodologia mais comum e bem aceita de cromatografia para a separação de misturas de proteínas. A catiônica oferece boa capacidade dinâmica, alta especificidade, boa escalabilidade, custo relativamente baixo e de simples execução (NADZIRAH et al., 2013).

Outra técnica que tem sido empregada na purificação de bromelina é a cromatografia de filtração em gel, que ocorre segundo a separação de moléculas em função de suas massas moleculares numa coluna envolta pela fase móvel. As matrizes (gel) são dotadas de esferas com poros que variam de tamanho, de acordo com o tipo da resina. As moléculas maiores não conseguem penetrar nos poros e são arrastadas pela fase móvel, enquanto as de menor tamanho são retidas por mais tempo no interior da coluna. A escolha da porosidade é fundamental, pois moléculas maiores saem primeiro e estão sujeitas a menor turbulência e difusão, já as moléculas menores, sujeitas a maior difusão e eluição em picos mais amplos em uma velocidade maior (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2004; NETO, 2005).

Vários fatores devem ser levados em consideração para se escolher o gel adequado, mas basicamente a escolha dependerá da finalidade a ser alcançada. Se o objetivo é a separação de moléculas grandes, por exemplo, enzimas, de moléculas pequenas como sais e outros solutos com massa molecular menor que 3000 Da, géis com poros pequenos são utilizados. Neste caso, as enzimas são excluídas dos poros e são eluídas na fase móvel. Géis adequados para este fim são, por exemplo, o Sephadex (Pharmacia) derivado do dextrano e Biogel (Bio-Rad). Para maior

resolução, géis com diâmetro menor (grau fino ou superfino) devem ser escolhidos (NETO, 2005).

Suh et. al. (1992) purificaram a bromelina do fruto e do talo até a homogeneidade por cromatografia de gel-filtração, com rendimento de apenas de 23% em atividade.

Hernandez et al. (2005), utilizaram Sephadex[®] G-100 como primeira etapa de purificação de bromelina com um rendimento de 87,81% de atividade.

Por fim, as técnicas cromatográficas são as mais utilizadas na purificação de bromelina, entretanto, é importante destacar que a escolha da estratégia cromatográfica para purificação de bromelina depende não somente da manutenção da atividade proteolítica, como do custo da obtenção do produto final e para qual fim se destina a enzima, uma vez que para determinados fins não é necessário a utilização de bromelina com alto grau de pureza. Assim, torna-se desafiador para indústria biotecnológica o desenvolvimento de estratégias cada vez mais atraentes, por exemplo, reduzindo os passos de purificação, tornando a metodologia mais viável economicamente, aumentando o rendimento em atividade da bromelina (COSTA; FERNANDES; VENTURA, 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma nova metodologia de purificação de bromelina a partir de caule de abacaxizeiro cultivar Vitória.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Analisar as características físico-químicas e da atividade da bromelina em frutos de abacaxi em diferentes estádios de maturação nas cvs. Pérola e Vitória;
- Determinar o teor de proteínas totais, atividade proteolítica e atividade específica de bromelina em diferentes estádios de maturação nas cvs. Pérola e Vitória.
- Extrair bromelina a partir de caules do abacaxizeiro cv. Vitória utilizando diferentes soluções de extração;
- Fazer uma comparação entre duas técnicas de precipitação na manutenção da atividade proteolítica de bromelina;
- Comparar a eficiência de resinas de cromatografia de troca iônica na manutenção da atividade da bromelina.
- Desenvolver uma nova metodologia de purificação de bromelina a partir de caule do abacaxizeiro cv. Vitória;
- Confirmar a pureza da bromelina obtida no processo utilizado na purificação;
- Calcular o rendimento de atividade em cada etapa do processo de obtenção da bromelina.
- Realizar a caracterização cinética de bromelina pré purificada e purificada;
- Avaliar a utilização dos resíduos agrícolas do abacaxizeiro cv. Vitória como potenciais fontes de obtenção de bromelina.

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão serão mostrados na forma dos artigos científicos preparados a partir dos dados obtidos com o desenvolvimento do trabalho de tese.

4.1 CAPÍTULO 1 – Artigo Submetido

Periódico – Scientia Horticulturae

Fator de Impacto – 1.396

Bromelain extraction, activity and chemical characterization at different stages of maturity in two pineapple varieties.

Helber B. Costa^{1‡}; Adriana M.N. Korres²; Glória M. V. Aquije²; Patricia M. B. Fernandes¹; José A. Ventura^{1,4†}

¹Núcleo de Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo 29040-090, Vitória, ES, Brasil

²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo, 29040-780, Vitória, ES, Brasil;

³Instituto Capixaba de Pesquisa Assistência Técnica e Extensão Rural - Incaper 29052-010, Vitória, ES, Brasil.

Corresponding authors:

† J.A.V : ventura@incaper.es.gov.br/ + + 55-27-3636-9817

‡ H.B.C: farmhel@gmail.com / Phone: + + 55-27-3149-0833

Abstract

The pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*) is a fruit widely accepted around the world. The physicochemical characteristics and activity of bromelain are related to the pineapple's nutritional and commercial quality. It is extremely important to search for new strategies to prolong storage life so that the fruit arrives at the consumers table with good quality. The physicochemical characteristics and activity of bromelain at all stages of maturation of the two pineapple cultivars (cv.); cv. Vitória (a new variety of pineapple resistant to fusariosis) and cv. Pérola were compared. The cultivar Vitória presented values of total soluble solids (14.3 to 17.3° Brix) superior to those of cv. Pérola at all stages of maturation. The acidity of the cultivars demonstrated a statistically significant difference ($P < 0.05$) in the final stage of maturation (Vitória 0.37% and Pérola 0.52%). At the last stage of maturation the ratio TSS/AT of cv. Vitória (42.77) was superior ($P < 0.05$) to that of cv. Pérola. The specific activity of bromelain of cv. Vitória was also superior to that of cv. Pérola at all stages of maturation, demonstrating a statistically significant difference only at stage 4 (908.11 U/mg). The fruit of cv. Vitória shows a differential in characteristics in comparison with the cv. Pérola currently commercialized. The high specific activity of bromelain found in the cultivar Vitória at stage 4 suggests that collection at this stage should better conserve the nutritional quality of the fruit, protecting it from internal browning, as well as indicating that this new variety will present greater health benefits.

Keywords: Postharvest; stages of maturity; Bromelain

1 INTRODUCTION

Brazil is among the world's largest producers of the pineapple *Ananas comosus* L. Merrill var. *comosus* (Coppens d'Eckenbrugge & Leal), with an estimated production of 2 million tons of fruit in 2010 (Faostat, 2012).

In November 2006, a new pineapple cultivar (cv.) Vitória was launched in the domestic market, having as a main characteristic resistance to fusariosis, a disease caused by the fungus *Fusarium guttiforme* Nirenberg and O'Donnell, which causes a 30-40% loss in fruit production in Brazil (Ventura and Zambolim, 2002; Ventura *et al.*, 2009).

The commercial quality of pineapple fruit is associated with its external physical characteristics (i.e., skin color, size, and shape of the fruit) and the internal characteristics that are determined by the physicochemical composition of the pulp, which is responsible for the flavor and nutritional value, especially the high sugar content. The ratio of total soluble solids/titratable acidity (TSS/TA) is related to the palatability and, hence, the consumer approval of the fruits (Freiman and Sabaa, 1999).

Another feature of the pineapple fruit is the high level of bromelain. Bromelain is comprised of a group of proteolytic enzymes found in plants of the *Bromeliaceae* family. The pineapple plant is the main source of these enzymes, which are found in the fruits (fruit bromelain EC 3.4.22.33), crowns, and stems (stem bromelain EC 3.4.22.32). Bromelain has a high commercial value due to its use in the food, textile, cosmetic, pharmaceutical, and brewing industries, as well as in medicine (Costa *et al.*, 2009).

According to Neuteboom *et al.* (2009), bromelain plays a role in the process of senescence and fruit ripening. The enzyme is not present in the early stages of fruit

development; however, its level increases rapidly and remains elevated up to the ripening stage, then decreases slightly after the ripening.

Interest in novel biotechnological processes has substantially grown in recent decades. The widespread use of bromelain has highlighted the importance of studying viable processes for extracting and purifying this group of enzymes. In addition, the purification process applied to new breeds that are fusariosis resistant may create opportunities to minimize losses and to add value to the pineapple agribusiness (Costa and Fernandes and Ventura, 2012).

Distribution of the cultivar Vitória is expanding within the national and international market; however, technical information about this variety is scarce. Therefore, the objective of the present study was to compare the bromelain activity and the physical and chemical characteristics of the two cultivars, Vitória and Pérola, at different maturation stages. This comparison would allow a correlation between fruit quality for consumer approval, as well as facilitating improved harvesting strategies to increase the shelf life of pineapples, thereby increasing their quality for the domestic and international markets.

2 METHODS

2.1 Fruit source and sample preparation

Pineapple fruits of cultivars Pérola and Vitória were produced at the Experimental Farm of Incaper in Sooretama, in the municipality of Sooretama-ES, where the plants were grown according to the technical recommendations for regional cultivation.

The fruits were harvested from each cultivar at six maturity stages and divided according to the color of the fruit skin, as follows: stage 0 (zero) = the color starts to change from green to yellow; stage 1 = $\frac{1}{4}$ of the fruit is yellow; stage 2 = $\frac{1}{2}$ of the fruit

is yellow; stage 3 = $\frac{3}{4}$ of the fruit is yellow; stage 4 = the fruit is completely yellow; and stage 5 = the fruit is fully ripe, with all of the fruitlets turned yellow (Py and Lacoecilhe and Teisson, 1984).

The fruits were cut into cubes, divided into 100 g samples, ground in a blender at a low speed (3,500 rpm) for 5 minutes (without the addition of water), and analyzed in the same day.

2.2 Total soluble solids (TSS)

The TSS were determined by the Hand Refractometer Instruction Operating (Euromex®) with reading range of 0 - 32°Brix Ref. 103, with a temperature compensation at 20°C, using the method recommended by the Adolfo Lutz Institute (IAL, 1985) .

2.3 Total titratable acids

The total titratable acids were measured in the juice by volumetry, using standardized 0.1 N NaOH, according to the standards specified by the Adolfo Lutz Institute (IAL, 1985) (1).

$$\text{Total titratable acids (\%)} = \frac{V \times f \times M \times 100}{P} \quad (1)$$

where:

V = volume (mL) of the NaOH solution used for titration

f = correction factor of the NaOH solution

M = molarity of the NaOH solution

P = sample mass (g) or volume (mL)

2.4 Ratio of total soluble solids/titratable acidity (TSS/TA)

The TSS/TA ratio was determined by dividing the value of the total soluble solids by the value of the total titratable acids.

2.5 Preparation of the crude pineapple extract

The samples were mixed with an extraction solution (0.4 M H₂SO₄; 2 mM Na₂SO₄, pH 4.5) in the proportion of 100 g of the sample to 130 mL of the extraction solution. The mixture was homogenized in a domestic blender for 5 minutes, filtered twice through cheese cloth, and filtered once more through filter paper. The whole procedure was performed in a refrigerator at 4°C to avoid denaturation of the bromelain enzyme. After filtration, the extract was centrifuged at 14,750 x g in a refrigerated centrifuge at 4°C for 20 minutes, and the supernatant was subsequently collected.

2.6 Protein content

The Bradford method (1976) was used to determine the total protein in crude extract, using bovine albumin as the standard.

2.7 Proteolytic activity

Determination of the proteolytic activity was performed in crude extract using the method to determine casein digestion units (CDU), using casein as a substrate in the presence of cysteine and EDTA (Murach and Neurath, 1976).

The absorbance of the filtrate was measured at 280 nm by a spectrophotometer (Thermo Spectronic ® BIOMATE 3) after the samples were incubated in presence of

casein at 37°C (pH 7), for 10 minutes. The enzyme activity was calculated and expressed in U/mL (2).

$$\text{Enzyme (U/mL)} = ((A_t - A_b) / A_{\text{tyrosine}}) \times (\mu\text{mol tyrosine}/V_1) \times V_2 \quad (2)$$

where:

A_t = absorbance of the sample tube

A_b = absorbance of the blank tube

A_{tyrosine} = absorbance of tyrosine

$\mu\text{mol tyrosine}$ = concentration of the tyrosine solution in the test tube

V_1 = volume added to the enzyme extract

V_2 = volume used in the test

2.7 Specific activity

The specific activity of the proteolytic enzymes was determined as the ratio between the proteolytic activity in U/mL and the protein content in mg/mL (3).

$$\text{Specific activity} = \frac{\text{Proteolytic activity (U/mL)}}{\text{Protein content (mg/mL)}} \quad (3)$$

2.8 Statistical analysis

The experiments were conducted using a completely randomized design with three replications for each treatment. The mean of the TA, pulp Brix, total protein, proteolytic activity, and specific activity of the crude extract were subjected to an analysis of variance (ANOVA) and a comparison of the means by Tukey's test (P

<0.05), using GraphPad Prism version 4.00 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA; Motulsky, 2003).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Chemical characterization

3.1.1 Total soluble solids

At all stages of maturation, cv. Vitória showed higher values of soluble solids in comparison with the values of cv. Pérola, with levels ranging from 14.3 to 17.3°Brix. The levels at the early stages of maturation (0, 1, 2, and 3), but not the later stages (4 and 5), were significantly different ($P < 0.05$) (Figure 1).

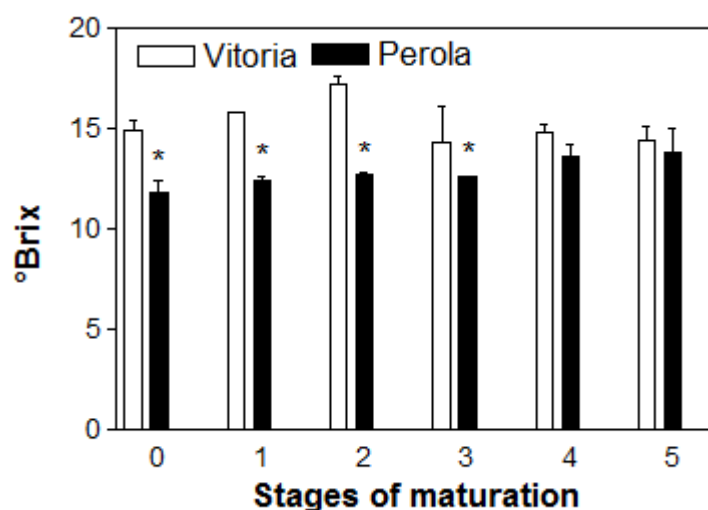


Figure 1 – Total soluble solids (°Brix) of cvs. Pérola and Vitória at different stages of fruit maturation. (*Tukey test, $P < 0.05$)

The sugar content (°Brix), is a variable of great importance in determining the fruit quality. The sugar content can be measured in the field using a manual refractometer, which provides rapid and practical readings that are used to monitor the fruit quality (Bengozi et al., 2007). Fruits with soluble solids below 12°Brix (12%) are considered immature and its sensory characteristics still not suitable for

consumption according established by CODEX and FAO/WHO(to the pineapple classification standards (Antunes et al., 2008).

The present results indicated that cv. Vitória has characteristics that are similar or superior to cv. Pérola, which is currently available on the market. This affirmation is possible because the market for the consumption of pineapple *in natura* the fruit is collected in stages 3 and 4 and when the goal is to export is performed in stage 2.

Abilio et al. (2009) performed a comparable analysis of cultivars Pérola, Smooth Cayenne, and MD-2 and did not find significant differences ($P < 0.05$) in the TSS among these pineapple cultivars. The significant differences found in the present study may be associated with the harvest seasons, the cropping systems, and the direct influence of the climate and harvest point (Bengozi et al., 2007).

3.1.2 Titratable acidity

The cv. Vitória exhibited levels of acidity that were expected for the pineapple, ranging from 0.76% (stage 0) to 0.37% (stage 5). In the first four stages of maturation, cv. Vitória presented higher acidity levels; however, the difference was not statistically significant. In contrast, during the last stage of maturation, cv. Pérola exhibited a higher acidity level than cv. Vitória (0.52% and 0.37%, respectively), which presents a statistically significant difference ($P < 0.05$), as presented in Figure 2.

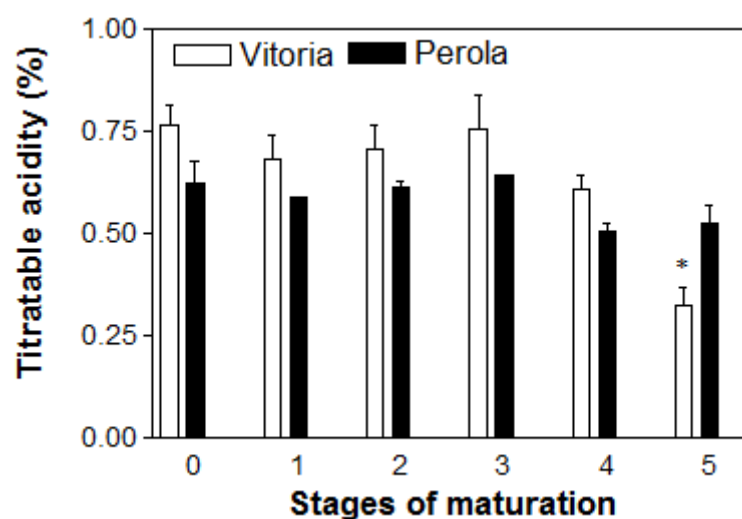


Figure 2 – Titratable acidity values at the different stages of maturation, expressed as percentiles (%) (*Tukey test, $P < 0.05$).

When a pineapple is ready for consumption, the acidity content is predominantly composed of citric acid (87%), in addition to malic and other acids (Salunkhe and Desai, 1984). The TA measures the total acid content present in the pineapple fruit.

The acidity of the pineapple varies based on factors such as the variety, maturation stage, plant fertilization, and production site, with the latter feature being mainly responsible for the flavor of the fruit and its commercial acceptance (The et al., 2010)

The acidity levels increase from the beginning of ripening, reach a maximum value approximately 10 days into the ripening period, and subsequently decrease sharply (Carvalho, 1999).

The decreased levels of organic acids throughout the pineapple ripening stage are attributed to the plant metabolism. The acids accumulate during the period of plant growth and, during the fruit ripening, are consumed by respiratory processes (*i.e.*, glycolysis and the citric acid cycle) or converted into sugars (gluconeogenesis) (Sha et al., 2011; The et al., 2010).

The TA values found in cv. Vitória were significantly lower ($P < 0.05$) than in cv. Pérola, during the last stage of maturation. This result indicates that, at the last maturation stage, cv. Vitória exhibits superior characteristics over the other varieties available in the market. However, Abilio et al. (2009) compared the acidity in cvs. Pérola, MD-2, and Smooth Cayenne in the last stage of maturation and found no significant differences ($P < 0.05$) (0.51%, 0.56%, and 0.43%, respectively).

The ratio TSS/TA is very important and used measure fruit quality in agricultural industry being tha the lower the acidity, the higher this ratio.

The pH, which is commonly correlated with the TA, is among the most used parameters for determining the fruit quality. According to Py et al. (1984), the pH values in pineapple juice vary from 3.0 to 4.0. However, the pH is not a parameter that should be directly associated with the TA. As previously mentioned, the predominant acids in pineapples are citric acid and malic acid, which are weak acids with low ionization constants (pK_a 3.15 and 3.4, respectively). There is a predominance of the protonated form of these acids depending on the pH. This fact signifies that changes in the quantity of these acids will not be detectable in pH measurements during the process of maturation, thereby rendering these measurements unreliable indicators.

3.1.3 Ratio of total soluble solids/titratable acidity

During the first four stages of maturation, there were no differences between the cultivars in their TSS/TA ratios; however, the TSS/TA ratio in cv. Vitória was significantly higher during the last maturation stage (Figure 3).

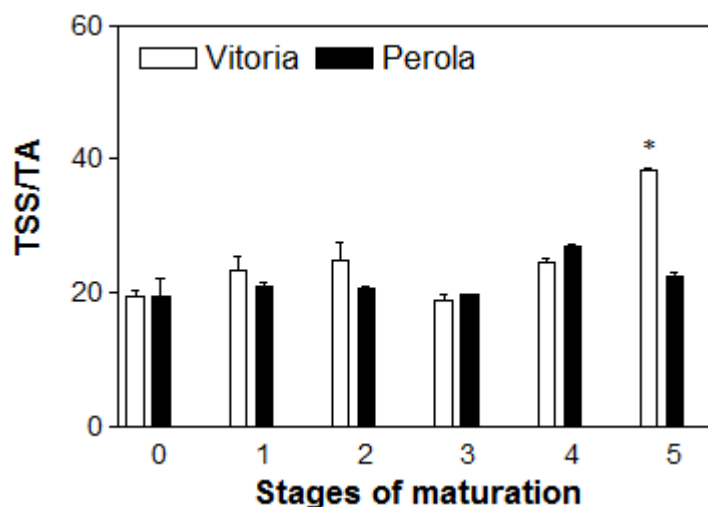


Figure 3 – TSS / TA ratios at the different maturation stages in the Vitória and Pérola pineapple cultivars (*Tukey test, $P < 0.05$).

Therefore, the high TSS/TA ratio (42.77), which resulted from the expected levels of soluble solids during the final maturation stage (14.4°Brix) and was normalized by the total TA, contributed to the sweetness of the Vitória pineapple. This result supported the previous indication that cv. Vitória exhibited an equivalent commercial quality and a better sensory quality compared with the current commercial varieties (Ventura *et al.*, 2009).

Consumers seek the appearance and sensory characteristics of the product. However, when intended for industrialization, interest is directed towards the raw material yield, color, flavor, and texture. High quality pineapple fruits have a high sugar content (TSS) and low acidity (TA) (Malézieux and Bartholomew, 2003). Thus, the physicochemical properties of the pineapple are important parameters for controlling the delivery of products with a quality that would be approved by consumers.

3.2 Total protein, activity, and specific activity of bromelain

The cv. Pérola yielded significantly higher levels of total protein and proteolytic activity compared with the cv. Vitória, at all maturity stages (Table 1).

Table 1. Comparison of the values of total proteins, proteolytic activity, and specific proteolytic activity at the different maturation stages in cultivars Vitória and Pérola

| Maturation stage | Total protein (mg/mL) ¹ | | Proteolytic activity (U/mL) ¹ | | Specific activity (U/mg) ¹ | |
|------------------|------------------------------------|----------------------|--|---------------------|---------------------------------------|----------------------|
| | cv. Vitória | cv. Pérola | cv. Vitória | cv. Pérola | cv. Vitória | cv. Pérola |
| 0 | 0.103 ^{aA} | 0.153 ^{bB} | 35.00 ^{aA} | 41.08 ^{bD} | 365.70 ^{aA} | 268.86 ^{aC} |
| 1 | 0.079 ^{aA} | 0.123 ^{bC} | 37.92 ^{aAB} | 44.06 ^{bC} | 483.70 ^{aA} | 358.21 ^{bB} |
| 2 | 0.098 ^{aA} | 0.218 ^{bA} | 40.66 ^{aABC} | 46.83 ^{bB} | 437.27 ^{aA} | 214.81 ^{bD} |
| 3 | 0.092 ^{aA} | 0.224 ^{bA} | 41.95 ^{aBC} | 47.12 ^{bB} | 468.39 ^{aA} | 210.08 ^{bD} |
| 4 | 0.045 ^{aA} | 0.067 ^{bD} | 39.73 ^{aABC} | 46.86 ^{bB} | 908.11 ^{aB} | 699.10 ^{bA} |
| 5 | 0.091 ^{aA} | 0.149 ^{bBC} | 45.04 ^{aC} | 56.21 ^{bA} | 497.85 ^{aA} | 375.50 ^{aB} |

¹ Average of three repetitions. The averages that are followed by the same letter in lowercase in comparison between cv. Vitória and cv. Pérola (on the line) do not differ. The averages followed by the same uppercase letter (within the column) do not differ ($P < 0.05$), as determined by the Tukey test.

The differences between the amounts of the total protein and proteolytic activity in the literature may be attributed to differences in the farming, soil, and climate conditions (Abilio et al., 2009).

The values may also differ because of the various buffers used to extract the enzyme. Factors such as the type and pH of the extraction buffer can lead to a loss of the three-dimensional structure of these complex molecules, consequently causing a partial or total loss of the enzyme activity (Cesar, 2005; The, 2010; Costa and Fernandes and Ventura, 2012).

The hydrogenionic concentration may affect the intermolecular interactions between the amino acid residues of bromelain, causing the enzyme to lose its tertiary structure, thereby undergoing changes in its active site and consequently losing its activity (Cesar, 2005; The, 2010; Costa and Fernandes and Ventura, 2012).

Bromelain is a cysteine protease and possesses sulfhydryl groups (-SH) in its active site that can undergo oxidation to form disulfide bridges. This process leads to autoproteolytic cleavage and, hence, loss of activity. The use of chemicals (such as salts of sulfides and sulfates) to protect the sulfhydryl group, with minimal oxidizing action in the extraction solution and improve protein solubility can preserve bromelain activity. Therefore, the use of Na_2SO_4 in the extraction solution would protect the active site of bromelain and thus maintain the activity of this enzyme.

With regard to the protease specific activity, both cultivars exhibited the same characteristics during the maturation process (Figure 4). César (2005) stated that the enzyme is not present during the early developmental stages of the fruit; however, the enzyme level increases rapidly as the fruit matures, remaining high until maturity and decreasing slightly during the final stage. The present study revealed that similar changes occur in cv. Vitória.

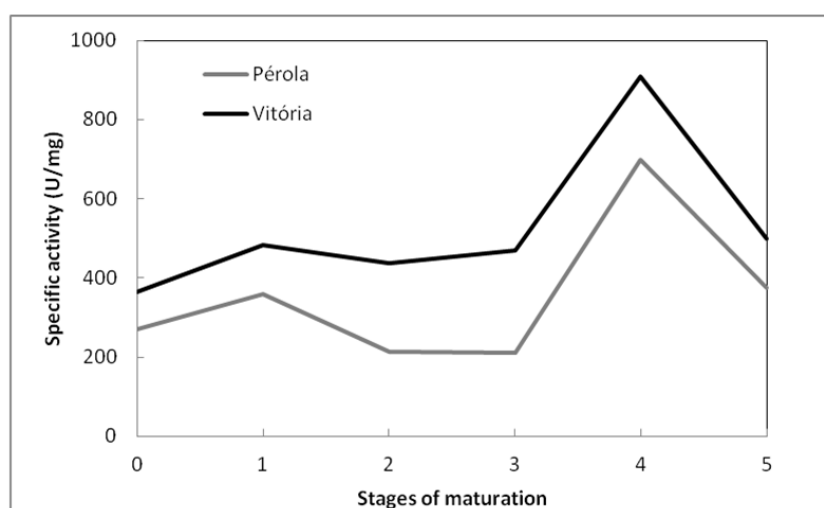


Figure 4 - Specific activity of bromelain from pineapple fruit at different stages of maturation of cvs. Vitória and Pérola.

The presence of bromelain depends on the stage of plant growth, and the enzyme is not found in extremely young or extremely old plants. Hence, bromelain is most likely converted into another protein possessing a different metabolic function, such as a flavor, during the different stages (Baldini et.al., 1993).

Comparing the two cultivars, the specific activity of bromelain in cv. Vitória was higher than cv. Pérola at all stages of maturation, being significantly different in stages 1 to 4 (Table 1).

Noteworthy is the difference found in the specific activity of bromelain in stage 4 of maturation for cv. Vitória (908.11U/mg) and cv. Pérola (699.10 U/mg). This result suggests that this stage was optimal for harvesting, when a longer period of preservation at a temperature below 10°C is required, such as during long-distance export particularly because fruits subjected to these conditions are susceptible to internal browning caused by a physiological disorder (Weerahewa and Adikaram, 2005). The high activity of bromelain can prevent the oxidation of polyphenols to quinones, which are the compounds responsible for the internal browning of the fruit, because the sulfhydryl groups present in the enzyme are protected from oxidative reactions.

Other factors, such as peroxidase and polyphenoloxidase activities, should also be evaluated because elevated activity of these enzymes increases the susceptibility to internal browning.

The high specific activity of bromelain in cv. Vitória may also protect nutrients that are susceptible to oxidation, thereby improving the nutritional value of the fruit.

These results allowed discussing a new point. The possibility for obtention of fruit bromelain from pineapple. This is an unusual activity because presents high costs and low yield for activity and quantity of this enzyme. Frequently bromelain is

obtained from pineapple residues. However, at the cases of bumper crop of pineapple the fruit cv. Vitória can be harvest in stage 4 of maturation to purification bromelain when the fruit presents high specific activity of bromelain. This strategy can be used to avoid total losses of pineapple production and the bromelain obtained from cv. Vitória will show higher activity than cv. Pérola. Thus, it's necessary to study new viable methods to obtain bromelain from pineapple fruit.

Konno et al. (2004) claim that proteolytic enzymes from the cysteine-peptidase class are related to the plants' main defense mechanisms. Thus, these results also indicate a possible relationship between the high specific activity of bromelain in this pineapple cultivar and its resistance to fusariosis.

Fusarium infection occurs at the onset of flowering, and although the specific activity values are lower during the early maturation stages, cv. Vitória presents higher values in all phases of plant development when compared to cv. Pérola. This finding indicates that the defense mechanisms of cv. Vitoria are more active, which can be one of the factors explaining their resistance to the fungus.

Abilio et al. (2009) compared fusariosis resistant cv. Imperial to cvs. Pérola, MD-2, and Smooth Cayenne and likewise found higher values of bromelain in all stages of plant development until the fruit ripened.

According to Hale et al. (2005), the beneficial health effects of proteolytic enzymes are predominantly found in the pineapple fruit. The following activities are among the many other benefits and beneficial effects of bromelain: antitumor and anti-inflammatory effects, improved immunomodulation, increased response to antibiotics, mucolytic and digestive actions, effects on circulatory and cardiovascular diseases, and utilization in surgical procedures and wound treatments (Costa et al., 2009). The higher values of bromelain specific activity in cv. Vitória may also indicate that this

cultivar will provide improved health benefits compared with the other pineapple varieties.

CONCLUSIONS

Pineapple cv. Vitória had higher TSS/TA ratios than cv. Pérola, which explains the consumers' approval after its introduction to the market. For the first time, the levels of bromelain activity at the different ripening stages of cv. Vitória were measured and the high specific activity found in stage 4 of maturation may indicate that harvesting the pineapples at this stage may help preserve the nutritional quality of the fruit as well as indicating that this new variety will present greater health benefits and may protect it from internal browning when stored at temperatures below 10°C, thereby increasing the shelf life and consequently ensuring the quality of the postharvested fruit. This work pointed to the necessity to study new viable methods for bromelain purification from pineapple fruits.

Acknowledgments

The authors thank Clair Barboza from Capixaba Research Institute, Technical Assistance and Rural Extension – Incaper. This work was supported by Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Banco do Nordeste do Brasil (BNB) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES).

REFERENCES

- Abilio, G.M.F., Holschuh, H.J., Bora, P.S., 2009. Extraction, bromelain activity and analysis of some chemical parameters in pineapple varieties from Paraíba Rev. Bras. Fruti. 31, 1117-1121.
- Antunes, A.M., Ono, E.O., Sampaio, A.C., 2008. Rodrigues, J.D. Physico-chemical and harvest time alterations in pineapple fruits Smooth Cayenne cause by paclobutrazol. Braz. Arch. Biol. Technol. 51, 19-26
- Baldini, V.L., Iderosa, M., Ferreira, E.A., Sales, A. M., Draetta, I.S., Giacomelli, E.J., 1993. Ocorrência da bromelina em espécies e cultivares de abacaxizeiro Colet.Inst.Tecnol.Aliment. 53,44-55.
- Bengozi, F.J., Sampaio, A.C., Spoto, M.H.F., Mischán, M.M., Pallamin, M.L., 2007. Physicochemical quality of pineapples commercialized in the CEAGESP, São Paul]. Rev. Bras. Frut. 29, 540-545.
- Bradford, M.M.A, 1976. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Bindind. Anal. Biochem. 72, 248-254.
- Carvalho, V.D., 1999. Composição, colheita, embalagem e transporte do fruto In: Cunha, G. A. P. da; Cabral, J. R. S.; Souza, L. F. da S. (Eds.). *O Abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia*. Embrapa pp. 367-388
- César, A. C. W., 2005. Análise de Viabilidade Econômica de um Processo de Extração e Purificação da Bromelina do Abacaxi. Campinas, Brazil; Universidade Estadual de Campinas, PhD thesis.
- Costa, H.B., Delboni, S.G., Fortunato, F.S. Ventura, J.A. 2009. Proteolytic activity in stems of 'Vitoria' , 'Smooth Cayenne' and 'Perola' pineapple plants. Act. Hort. 822, 239-244.
- Costa, H.B., Fernandes, P.M.B, Ventura, J.A, 2012. Processo de purificação de bromelina, bromelina purificada e usos da enzima purificada. Brazilian patente PI10201027122,
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food quantity. FAOSTAT, 2012. Available at: < www.faostat.fao.org >
- Freiman, L.O., Sabaa Srur, A.U.O, 1999. Determinação de proteína total e escore de aminoácidos de bromelinas extraídas dos resíduos do abacaxizeiro (*Ananas comosus*). (L.) Merrill. Food. Scienc. Tech.19, 170-173.
- Hale, L.P., Greer, P.K., Trinh, C.T., James, C.L., 2005 Proteinase Activity and Stability of natural bromelain preparations. Int. Immunopharmacol. 5, 783-793.
- Instituto Adolfo Lutz. 1985. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. Tirth edition. IMESP, São Paulo.
- Konno, K., Hirayama, C., Nakamura, M., Tateishi, K., Tamura, Y., Hattori, M., Kohno, K. 2004. Papain protects treens from herbivorous insects: role of cysteine proteases in látex. Plant. J. 37, 370-378.
- Maisonneuve et Larose et A. C. C. T, Paris.
- Malezieux, E., Bartholomew, D.P., 2003. Plant Nutrition. In: Bartholomew, D.P.; Paul, R.E., Rohbach, K.G (Eds.). *The pineapple: botany, production and uses*. CABI Publishing, pp.143-165.
- Motulsky, H., 2003. GraphPad Prism: user's guide. v.4.00. San Diego-CA.
- Murachi, T., Neurath, H., 1976. Fractionation and specificity studies on Stem Bromelain. J. Biol. Chem. 235, 99-107.
- Neuteboom, L.W., Matsumoto, K.O., Christopher, D.A., 2009. An extend AE-Rich N-terminal trunk in secreted pineapple cystatin enhances inhibition of fruit

- bromelain and is post translationally removed during ripening. *Plant. Physiol.* 151, 515-527.
- Py, C., Lacoeyuilhe, J.J., Teisson, C., 1984. L'ananas as culture, sés produits.
- Salunkhe, D. K., Desai, B.B, 1984. Postharvest biotechnology of fruits. CRC, Boca Raton.
- Sha, S.F., Li, J.C., Wu, J., Zhang, S.L., 2011. Change the organic acid content and related metabolic enzyme activities in developing 'Xiping pear fruit. *Afr. J. Agric. Reseach.* 25, 3560-3567.
- The, P.M.P., Nunes, R.P., Moreira da Silva, L.I.M., Araujo, B. M., 2010. Chemical, physical, physicochemical and enzymatic activity attributes of recently harvested pineapple cv. *Smooth Cayenne*. *Alim.Nutr.* 21, 273-281.
- Ventura, J.A., Cabral, J.R.S, Matos, A.P., Costa, H., 2009. 'Vitória': new pineapple cultivar resistant to fusariose. *Act. Hort.* 822, 51-54.
- Ventura, J.A., Zambolim, L., 2002. Controle das doenças do abacaxizeiro, in: Zambolim, L., Vale, F.X.R., Monteiro, A.J.A., Costa, H. (Eds.), *Controle de doenças de plantas fruteiras*. Federal University of Viçosa, Viçosa, pp. 445 - 510.
- Weerahewa, D., Adikaran, N.K.B., 2005. Some biochemical factors underlying the differential susceptibility of two pineapple cultivars to internal browning disorder. *Ceylon J. Sci. (Biological Sciences)* 34, 7-20

4.2 CAPÍTULO 2– Artigo Submetido

Periódico – The Scientific World Journal

Fator de Impacto –1.73

Innovation in the bromelain extraction and purification process with of maintenance of high proteolytic activity

Helber B. Costa^{1†}; Patricia M. B. Fernandes¹; José A. Ventura^{1,2†}

¹Núcleo de Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo 29040-090, Vitória, ES, Brasil

²Instituto Capixaba de Pesquisa Assistência Técnica e Extensão Rural - Incaper 29052-010, Vitória, ES, Brasil.

Corresponding authors:

† J.A.V : ventura@incaper.es.gov.br / + + 55-27-36369817

‡ H.B.C: farmhel@gmail.com / Phone: + + 55-27-3149-0833

Abstract

Bromelain is an enzyme with wide commercial acceptance, of interest for use in the pharmaceutical, food and biotechnical industries. Because of increasing demand, researchers in biotechnology are constantly seeking, to improve the steps for purification of this enzyme in pursuit of reducing the cost of the final product. Purifying bromelain is challenging, because it is necessary to maintain elevated the proteolytic activity during extraction and purification, since the enzyme's utility is related to this activity. For that reason in the present work a comparison was made of the efficacy of different forms of extraction and partial purification of bromelain from cv. Vitória plant residues with the objective of evaluating efficiency of extraction, and maintenance of proteolytic activity during extraction. Of the different forms of extraction, the solution of $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{Na}_2\text{SO}_4$ pH 4.5 maintained higher values of proteolytic and specific activity than the forms of extraction currently in use. Fractional precipitation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ produced larger yields (98.42%) of bromelain recovery in comparison with those resulting from precipitation by acetone. And the chromatography by carboxymethyl cellulose was an excellent technique that maintained high values of proteolytic activity. The combination of techniques used here maintain higher bromelain proteolytic activity values than the existing methodologies.

Keywords: Bromelain; extraction strategies; purification process

1 INTRODUCTION

Bromelain is a proteolytic enzyme belonging to the cysteine peptidase family. This enzyme can be found in tissues of the Bromeliaceae family of plants, the pineapple plant (*Ananas comosus* var. *comosus*) being its main source [1,2]. Bromelain is not present in the first stages of fruit development, however, its level increases, rapidly, remaining elevated until ripening, when there is a small decrease in its level. This is one of the advantages of utilization of the pineapple plant as a source of proteases [3].

Bromelain presents a wide biotechnical application, being of interest for the alimentary, cosmetic and pharmaceutical industries, with many clinical applications, such as, an antitumoral agent, as an immunomodulator, antibiotic potentiator, as a mucolytic, for its digestive action, besides its utilization in the treatment of cardiovascular and circulatory diseases, as well as being used in surgical procedures and wound treatment [1,2,4].

As a result of the wide range of applications in which bromelain is used, there is a high demand for this enzyme. However the commercially available enzyme is very expensive (2,400 USD per kilogram) [5]. Because of that consideration, there is an ever increasing interest in the biotechnical industry in the development of purification strategies that increase this enzyme's degree of purity and enzymatic activity while reducing the procurement costs for this enzyme.

The key to successful and efficient purification of bromelain is to select the most adequate technique, optimize its performance to meet the demands of the consumer and to combine these elements in a logical way that maximizes productivity while reducing the number of steps required for the purification. Moreover, also contributing to such success is the development of new techniques or improvements in the

existing techniques for extraction and purification which provide improved levels of enzymatic activity; given that all of the utility of the enzyme rests in this property [6,7]. The goal of this work was to make a comparison of the effectiveness of five different forms of bromelain extraction from pineapple plant residues, a comparison of two different forms of fractional precipitation and a comparison of the partial purification by chromatography of the crude extract with three different ion exchange resins to evaluate their relative effectiveness for purification and maintenance of the enzyme's proteolytic activity.

2 .METHODS

2.1 Pineapple wastes

Pineapple wastes from cv. Vitória were obtained from Incaper Sooretama Experimental Farm, Sooretama-ES, Brazil.

2.2 Chemicals

All of the chemical products were purchased from Sigma, Merck or GE (USA) except for the HPLC grade products which were purchased from Tedia Brazil.

2.2 Crude Extracts

A determined quantity of five samples of wastes from the same batch were crushed for five minutes, at 4°C, using five different extraction solutions (1- 0.4 M H₂SO₄ / 2 mM Na₂SO₄ pH 4.5 ; 2 – Acetate buffer pH 3.6; 3- Acetate buffer pH 4; 4- Acetate Buffer pH 5 ;5- phosphate buffer pH 7). After that, each extract was filtered and then centrifuged (Eppendorf centrifuges 5804 R, Germany) at 14,750 x g for 20 min at 4°C. The supernatant (crude protein extract) obtained from each extraction solution

was submitted to protein concentration determination and bromelain activity measurement.

2.3 Protein concentration determination

Protein concentrations of the crude extracts were determined using bovine serum albumin as the standard [8].

2.4 Bromelain Activity Measurement Procedure

Bromelain activity was determined in casein digestion units (CDU), using casein substrate in the presence of cysteine and EDTA (Murachi, 1976 with modifications).

The assays were based on the proteolytic hydrolysis of the casein substrate.

The absorbance of clear filtrate (solubilized casein) was measured at 280 nm using a spectrophotometer (Biomate 3). One unit of bromelain activity was defined as 1 µg of tyrosine released in 1 min per mL of sample when casein was hydrolysed under the standard conditions of 37°C and pH 7.0 for 10 min.

The sample analyses were performed against their respective blank solutions. Protein concentration readings were taken in triplicate and the average value of the results was used in the calculation of the extraction efficiencies. The specific activity, activity recovery (%) and the estimated purification factors were calculated as shown below:

$$\text{Specific activity} = \frac{\text{Proteolytic activity (U/mL)}}{\text{Protein content (mg/mL)}} \quad (1)$$

$$\text{Bromelain Recovery (\%)} = \frac{\text{Bromelain activity after purification}}{\text{Bromelain activity of crude extract}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Purification Factor (PF)} = \frac{\text{Specific activity after purification}}{\text{Specific activity of crude extract}} \quad (3)$$

2.5 Acetone Fractional Precipitation

For the acetone precipitation fractionation one half (1/2) of the crude extract produced and selected for further study was put into a beaker and placed on a magnetic stirrer in a glass door refrigerator with the temperature maintained at 4°C. Afterwards, cold acetone in the proportion of 20 % of the volume of the extract was added to the beaker. The cold acetone was added slowly (10 ml/min) and in small portions, to avoid denaturation of the protein. After addition of the solvent, the extract was stirred for 20 min to obtain complete homogenization of the mixture. The fractionation was performed by centrifugation of the mixture for 20 min at 1.950 x g and 4 °C. The supernatant volume was then measured after the precipitate had been recovered in the minimum volume possible of acetone (Fraction F1A). To the first supernatant there was then added cold acetone until 50% of its volume was reached. As in the first step, the resulting sample was again centrifuged in the same way and the precipitate was solubilized in precipitation buffer (Fraction F2A). The second supernatant then was submitted to precipitation using 75% of its volume of cold acetone; subsequently proceeding in the same way as in the two previous operations, to obtain fraction F3A. At all fractions (F1A, F2A and F3A) were determined the protein content and bromelain activity measurements as previously described.

2.6 Ammonium Sulfate Fractional Precipitation

For the ammonium sulfate fractional precipitation one half (1/2) of the crude extract produced and selected for further study was put in a beaker and taken to a magnetic stirrer in a glass door refrigerator at a controlled temperature of 4°C. Afterwards, ammonium sulfate (NH₄)₂SO₄ was added to the extract to 20% saturation. The addition of the salt was performed slowly (about 1g/min) and in small portions, waiting for the crystals to dissolve completely before adding more salt to the extract. After addition of the salt, the extract was stirred for 20 min to attain complete solution of the salt. This first fraction was separated by centrifugation for 20 min at 11.950g, and 4 °C. The supernatant volume was measured and the precipitated protein was recovered in the minimum volume possible of the precipitation buffer, (Fraction F1S). To the supernatant there was then added ammonium sulfate until reaching 50% saturation. As in the first step, the sample was centrifuged in the same way the precipitate being dissolved in extraction buffer (Fraction F2S). The new supernatant then being submitted to precipitation by up to 75% saturation of the salt and proceeding in the same way as in the two preceding operations to obtain the fraction F3S. At all fractions (F1S, F2S and F3S) were determined the protein content and bromelain activity measurements as previously described.

2.7 Dialysis

After their resuspension, the sulfate fractions (F1S, F2S and F3S) were dialyzed using semi permeable membranes having a porosity of 3.5 kDa (Sigma Aldrich ®). They were dialyzed repeatedly against distilled water. The fractions were maintained in constant, slow agitation while the distilled water was changed at hourly intervals and were stored at glass door refrigerator at 4°C.

2.8 Ion Exchange Chromatography

For the ion exchange chromatography of the bromelain, the anion exchange resin DEAE (Diethylaminoethyl Cellulose (GE®)), the cation exchange resin CM (Carboxymethyl Cellulose (SIGMA®)), and SP (Sulfopropyl Sepharose (SIGMA®)), were used, set up in three glass columns (25 mm ID and 110 mm long) there being one for each of the three resins tested.

In one column the DEAE resin was equilibrated with 10mM TrisHCl buffer pH 7.0 ; an aliquot of the dialyzed sample was then applied. After the sample had been in contact with the resin for 1 hour, the same buffer was utilized to elute the sample at a flow rate of 0.5 ml/min. The fractions were collected in 4 ml aliquots, the presence of the proteins during the chromatography being monitored with a recording spectrophotometer at 280 nm, using the same buffer as the blank and bromelain activity measurements. After finishing the elution a 0.1M NaCl solution was passed through the columns maintaining the same flow until it was protein free. The resin was then kept in this solution until the next utilization.

In the other two columns the other resins (SP-Sepharose and CM-CELLULOSE) were initially equilibrated with 0,005 M acetate buffer pH 5. After equilibration, dialyzate was pipetted into the columns and allowed to remain in contact with the resin for one hour. The samples were then eluted with acetate buffer (NaOAc) at 0.1 M, 0.3M and 0.5 M concentrations at a flow rate of 0.5 ml.min⁻¹. The fractions were then collected in 4 ml aliquots. Different buffer concentrations were used to evaluate the effects of concentration on proteolytic activity. The presence of proteins during the chromatography was monitored using a UV spectrophotometer at 280 nm, using the acetate buffer as blank and bromelain activity measurements. After finishing the elution a 2M NaCl solution was passed through the columns until it was protein free.

The resin was then kept in this solution until the next utilization. All the procedures were performed in the refrigerated environment of a glass door refrigerator at 4°C.

2.9 SDS-Page

SDS-PAGE was performed using 15% (w/v) polyacrylamide gels. Gel staining was performed using Coomassie brilliant blue G-250 [9].

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Crude extract preparation

Three of the extraction solutions used for extraction of total proteins, H₂SO₄/Na₂SO₄, acetate buffer pH 4 and acetate buffer pH 5, did not differ significantly (p value<0.05) in their yield, thereby being the best, since the extracts obtained presented the higher values of total protein (1.17 mg/ml, 1.13 mg/ml and 0.98 mg/ml respectively). Moreover, the crude extract obtained using the sulfuric acid/ sodium sulfate solution presented the highest value of proteolytic and specific activity (37.54 U/ml and 32.08 U/mg respectively), this result differing significantly (p<0.05) from the other extraction solutions used (Table 1).

Table 1 -Values of protein content, proteolytic and specific activities, of the protein extracts obtained with the different extraction solutions:

| Extraction solutions | Protein content (mg/mL) ¹ | Proteolytic activity (U/mL) ¹ | Specific activity (U/mg) ¹ |
|--|--------------------------------------|--|---------------------------------------|
| H ₂ SO ₄ / Na ₂ SO ₄ | 1.17 ^a | 37.54 ^a | 32.08 ^a |
| Acetate buffer pH 3.6 | 0.458 ^c | 9.71 ^b | 21.20 ^b |
| Acetate buffer pH 4.0 | 1.13 ^{ab} | 15.56 ^c | 13.78 ^c |
| Acetate buffer pH 5.0 | 0.98 ^{ab} | 13.83 ^c | 14.11 ^c |
| Phosphate buffer pH 7.0 | 0.878 ^b | 17.19 ^c | 19.57 ^d |

¹ Average of three repetitions. Averages followed by the same letters in a column, do not differ from each other at the 5% level of probability by Tukey's Test.

During the extraction and purification processes peptidases are susceptible to oxidation and autolysis. The latter especially, can constitute a source of heterogeneity and loss of activity, which can be eliminated by reversible blockage of the active site [10].

That justifies the utilization of sodium sulfate in the extraction solution chosen, because the addition of the sulfate allows for protection of the sulfhydryl groups that are found at the active site of the enzyme and whose inactivation causes the loss of activity.

The optimum pH for bromelain is around 7.0- 8.0. The success of the extraction process for bromelain in the presence of sulfuric acid demonstrates that this procedure can be accomplished at a pH far from the optimum, allowing a decrease in auto proteolysis [11,7] .

This is the first time that a comparison of bromelain extraction procedures has been done for the cultivar Vitória recently developed at this facility. The extract obtained with the use of sulfuric acid/sodium sulfate solution was chosen for the succeeding purification stages, discarding from consideration use of the other extraction buffers for the standardization of bromelain extraction from cv. Vitória because extraction with that solution gave a larger return of total protein, besides yielding higher proteolytic activity. Moreover, the extract obtained through the use of sulfuric acid/sodium sulfate solution also yielded proteins with the greatest value of specific activity for proteolytic enzymes of the pineapple plant.

3.2 Fractional precipitation

In the comparison of the two techniques for fractional precipitation, precipitation by ammonium sulfate was more effective in the maintenance of proteolytic activity in the

fractions 20– 50% (F2S) and 50-75% (F3S), because there were significant differences ($p < 0.05$) with regard to the total protein extract. Using the ratio between the activities of the precipitation fractions and the activity of the total protein extract, it can be seen that these fractions presented proteolytic activity nearer that of the total protein extract with 88.57% and 98.42% recovery, respectively. The fraction F3S is the fraction which best recovers bromelain activity (Table 2).

Table 2 - Comparison of the values obtained by use of fractional precipitation with ammonium sulfate and cold acetone

| Fraction | Protein content (mg/mL) ¹ | Proteolytic activity (U/mL) ¹ | Recovery (%) ¹ | Specific activity (U/mg) ¹ | Fold Purity (PF) |
|---------------|--------------------------------------|--|---------------------------|---------------------------------------|------------------|
| Crude Extract | 1,17 ^a | 37,54 ^a | 100 ^a | 32,09 ^a | 1.00 |
| F1S | 0,41 ^b | 8,13 ^b | 21,65 ^b | 19,82 ^b | 0,61 |
| F2S | 0,921 ^c | 33,25 ^{ac} | 88,57 ^c | 36,10 ^{ac} | 1,12 |
| F3S | 0,785 ^d | 36,95 ^{ac} | 98,42 ^{ac} | 47,07 ^d | 1,46 |
| F1A | 0,498 ^{be} | 31,12 ^c | 82,89 ^c | 62,48 ^e | 1,94 |
| F2A | 0,541 ^{be} | 21,70 ^d | 57,80 ^d | 40,11 ^c | 1,24 |
| F3A | 1,048 ^{ac} | 16,58 ^e | 44,16 ^e | 15,82 ^d | 0,49 |

¹ Average of three repetitions. Averages followed the same letters in a column, do not differ from each other at a 5% level of probability by Tukey's Test.

The results indicate that precipitation using ammonium sulfate is the most effective technique for the initial steps in bromelain purification and concentration, taking into consideration the maintenance of proteolytic activity.

Protease activity of heads of *Salmo gairdnerii* was measured, and noted that, for these proteolytic enzymes, precipitation by the use of cold acetone is the method to best maintain proteolytic activity which as can be seen in Table 2, is not applicable to bromelain extraction [12].

In a general way, when proteins are dissolved in water or electrolyte solutions repulsive electrostatic forces develop, because of the presence of a solvation layer around the hydrophilic surface areas of the protein, which produces a concentration

gradient, dampening the electrostatic attraction between the molecules and inhibiting aggregation; also solvent interactions with the internal hydrophobic zones of the protein can cause an irreversible deformation of the protein which causes denaturation [13]. However, when an acid salt is added to the solvent containing the protein, solvation layer compression occurs causing an increase in protein-protein interactions. As the salt concentration is increased the charges on the surface of the protein interact with the salt, not with the water exposing hydrophobic areas and in that way promoting aggregation and precipitation of the protein molecules.

In the case of bromelain the addition of acid salts, especially $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in high concentrations, reduces the availability of water due to ionic hydration, creating conditions favorable for the precipitation of the enzyme, which occurs mostly because of interaction of the hydrophobic zones [13]. The addition of a salt such as $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ increases the ionic force in such a way that the protein molecules aggregate and precipitate. In practice it is generally preferable to use less expensive salts, of low impurity and having high solubility, the use of ammonium sulfate being a common practice [14].

3.3 Ion exchange chromatography

After fractional precipitation using ammonium sulfate, fraction F3S was dialysed and stored at glass door refrigerator at 4°C. After that, three aliquots were submitted to chromatographies (Aliquot 1 – DEAE Cellulose; Aliquot 2 – SP- Sepharose and Aliquot 3 – CM-Cellulose). This fraction was chosen to continue the purification because it showed highest activity proteolytic and recovery than others as previously related.

Thirty five (35) subfractions were collected in the chromatography done using DEAE-

cellulose (Figure 1a). Of these, eighteen (18) were collected with the first buffer (TrisHCl pH 7.0 10mM). When zero absorbance was reached, NaCl was inserted (arrow –Figure 1a) and seventeen (17) more subfractions were collected. The proteolytic activity in the first peak was 11.91 U/ml (3rd subfraction). The second peak (Subfraction 21 – 26) whose mobile phase was NaCl, which was used for the removal of the retained proteins, had an activity level of 3.37 U/ml (22nd subfraction) From the SP-Sepharose column, forty seven (47) subfractions were collected (Figure 1b). Of these, eighteen (18) were from elution with 0.1 M acetate buffer (peak 1), while twenty two (22) subfractions were eluted with 0.3 M acetate buffer (peak 2) and the last seven (7) were eluted with 0.5M acetate buffer (peak 3). The second peak that was eluted with 0.3 M acetate buffer presented the higher proteolytic activity (2.23 U/ml) (29th subfraction)

The number of subfractions eluted from the CMC column was thirty seven (37) (Figure 1c). Of those, nineteen (19) were eluted with acetate buffer 0.1M (peak 1), fourteen (14) with 0.3 M acetate buffer (peak 2) and four (4) were eluted with 0.5M acetate buffer (peak 3). The second peak from the subfraction which was eluted with 0.3 M acetate buffer, presented higher proteolytic activity (14.12 U/ml)(26th subfraction)

The fraction F3S which was applied to the DEAE column to be eluted had an activity level of 30.82 U/ml. The subfraction eluted with the greater proteolytic activity seen in peak 1 (Third Subfraction – Figure 1a) had an activity level of 11.91 U/ml which indicated that there was a 38 % recovery of the proteolytic activity.

Biomolecular purifications using DEAE resins increase the purification cost considerably [15].

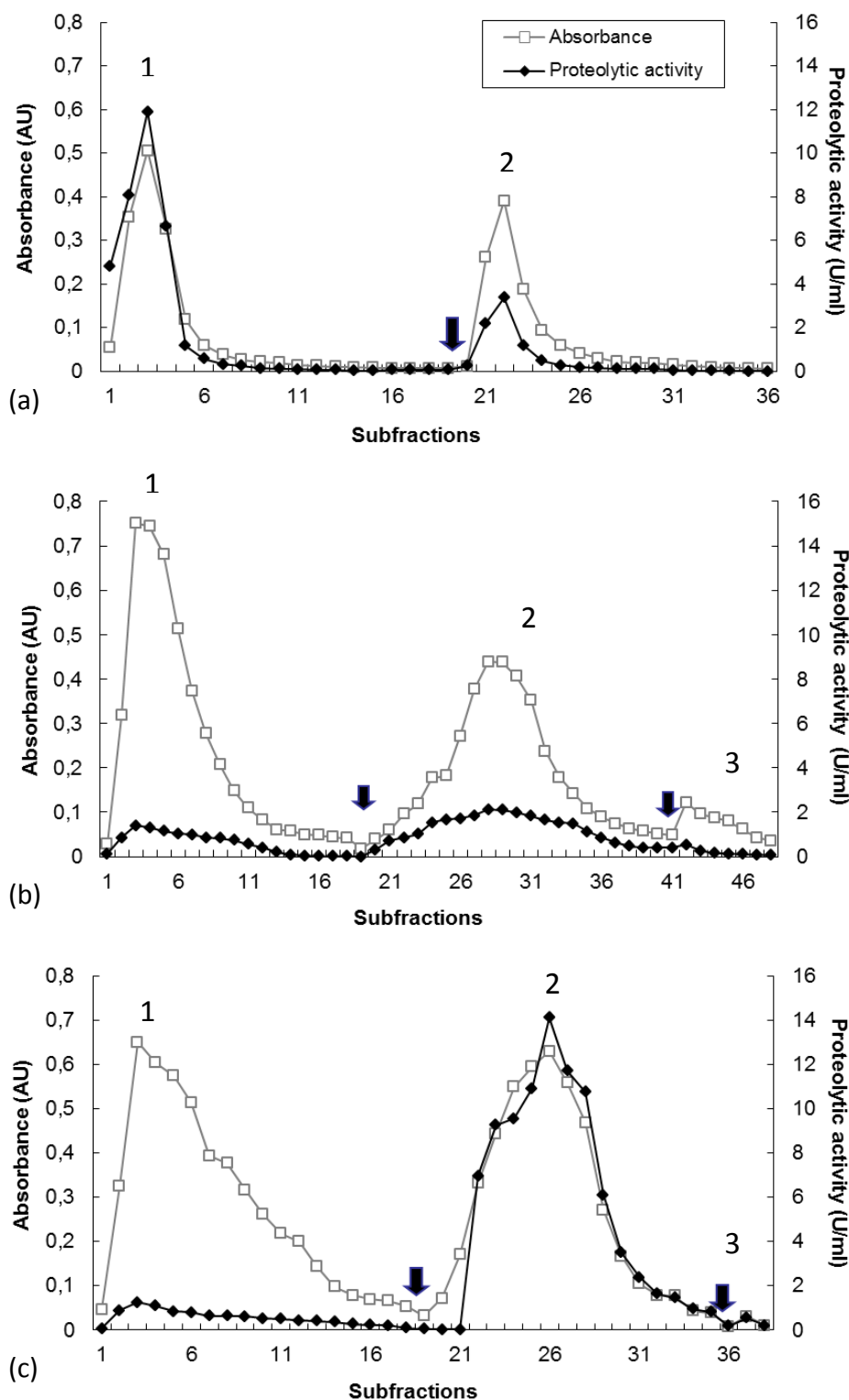


Figure 1- Chromatograms of the fraction F3S eluted from (a) DEAE- cellulose (b) SP-Sephrose and (c) CM- cellulose. In (a) Subfractions eluted with Tris buffer (peak 1) and subfractions eluted with NaCl (peak 2). In (b) and (c) columns using increasing concentrations of acetate buffer; 0.1M (Peak 1), 0.3 M (Peak 2) and 0.5 M (peak 3).

DEAE was used to purify bromelain, and obtained lower values of activity, which can be attributed not only to the resin used but also to the fact that the protein extract was obtained using a 10 % NaCl Solution [16].

Proteins are amphiphilic and have a positive or negative net charge, depending on the pH of the medium and have, as well, an isoelectric point (pI) of pH at which the net charge of the protein is zero. Therefore, for their purification either anionic or cationic exchange resins can be used. The choice of exchange resin will depend, among other considerations, on the protein's stability at the pH to be used [17].

Thus, the fall in activity observed in DEAE chromatography may be related to the pH of the buffer that was selected for elution (pH 7). The pH value adopted is in bromelain's optimal performance range, which could have contributed to auto proteolysis liberating small residual fragments of bromelain with some proteolytic activity. That possibility is corroborated, when SDS-PAGE 15% is observed (Figure 2-line 2). The peak line of higher activity of this chromatograph is seen as a prominent band at 28 kDa, while there is also another less intense band at a lower molecular weight.

The fraction F3S was applied to the SP-Sepharose column to be eluted having an activity level of 15.81 U/ml. The fraction eluted which had the higher proteolytic activity seen in Peak 2 (Figure 1b – 28th subfraction) had a level of 2.23 U/ml. That indicates that, there was a proteolytic activity recovery of 14%.

One can observe in the SP-Sepharose chromatogram (Figure 1b) that besides a significant loss of activity, that in all the buffers used for elution, there were also present anionic proteins or anionic fragments of bromelain with relatively little proteolytic activity.

The fraction F3S applied to the CM-cellulose column to be eluted presented an

activity of 15.81 U/ml. The subfraction eluted having the higher proteolytic activity seen in peak 2 (Figure 1c - 26th subfraction) had an activity level of 14.12 U/ml which indicates that, there was a recovery of proteolytic activity of 89.31 %.

In F3S's chromatogram from the CMC column (Figure 1c), it can be noted in the first peak that there were eluted anionic proteins that do not have proteolytic activity or only have low activity. The second peak represents the bromelain peak that eluted with the high proteolytic activity

Upon analysis of the three chromatograms shown previously, it is possible to make a clear comparison between the efficacies of the ion exchange resins used. The resin which best maintained the proteolytic activity was CM-cellulose, this then being the better choice, in this case, for the purification of bromelain.

Fruit bromelain was purified using CMC, with a return of 84.5 % of activity from the crude extract, and considered the bromelain obtained three times purer in comparison with that obtained by fractionation with ammonium sulfate [18].

Previously work [19] made a comparison using SP-sepharose and CM-sepharose in Brofasina's Purification, of a cysteine protease, that is present in gravatá (*Bromelia splendida*) and shares a protein sequence identity of 89 % with bromelain. It was noted that despite the fact that SP-sepharose has presented good results with brofasina the greatest purification obtained was by chromatography using CM-sepharose. No comparisons of the efficiencies of ion exchange resins have been reported, as yet, for purification of the bromelain of the pineapple cultivar Vitória.

3.4 SDS- PAGE

The chromatographic results were corroborated by SDS-PAGE 15% considering that the bromelain complex of enzymes presents a molecular mass close to 31 kDa [20],

in Figure 2, where it is possible to visualize only one band; In line 4 (CMC) near this region, that corresponds to the subfraction collected of the second peak eluted with acetate buffer 0.3 M, indicating the partial purification of the bromelain with high proteolytic activity. Moreover, when observing line (2) that is associated with the fraction from DEAE having higher activity, one notes that the protein purification was not perfect. And still more, the chromatography of the fraction with higher proteolytic activity from SP-sepharose, when examined suggests one treats with some other purified protein, or, of bromelain auto proteolysis by-products.

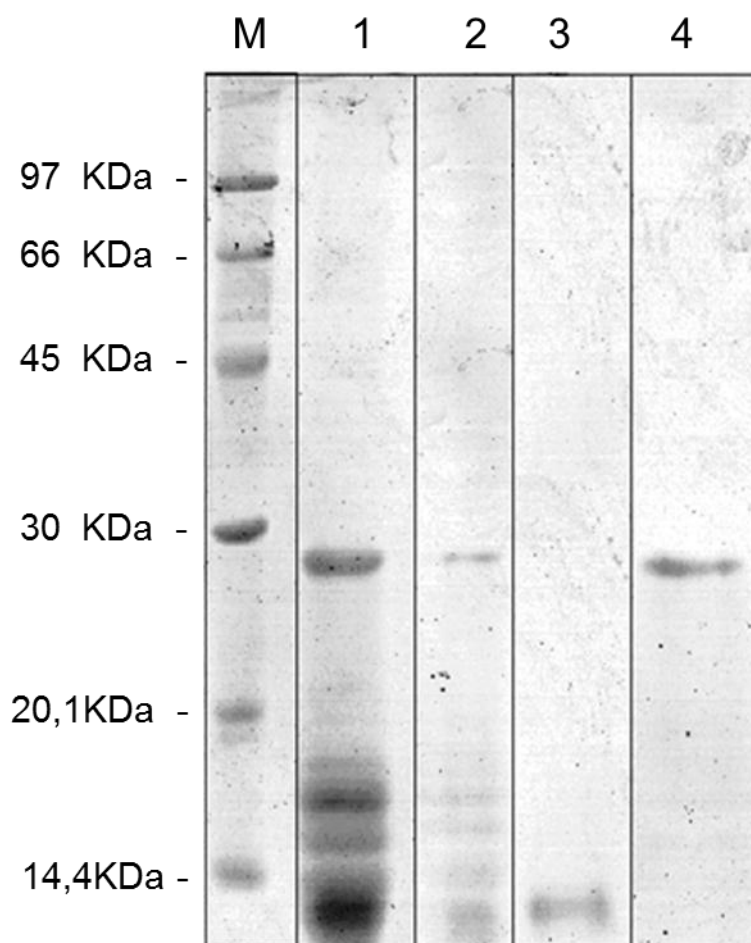


Figure 2 - SDS-Page 15% in comparison with the peaks of fractions having higher proteolytic activity collected from chromatography with different resins . (M- Marker of molecular Weight, 1- F3S ; 2- DEAE, 3- SP-Sepharose and 4 - CMC).

The analysis by SDS-Page suggests that bromelain purification using CMC as the chromatographic resin is viable and that the estimated molecular weight for bromelain is approximately 30 kDa, as reported in previous works [21]

4 CONCLUSIONS

Extraction with a solution of $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{Na}_2\text{SO}_4$ pH 4.5 maintained higher values of the proteolytic activity of bromelain. The values of proteolytic activity found are superior to those found in the existing methodologies reported up to the present moment. And, after analysis of the three chromatograms shown, it is possible to make a comparison between the ion exchange resins used and thereby conclude that the resin which best maintained the proteolytic activity was the CM-cellulose resin, that then, being the better choice for purifying bromelain. The combination of techniques employed in the present study maintain the values of proteolytic activity of bromelain higher after purification than is reported with the existing associations of procedures in use, indicating that this sequence of procedures has potential for application in the biotechnical industry.

Acknowledgments

The authors thank Clair Barbosa from Capixaba Research Institute, Technical Assistance and Rural Extension – Incaper. This work was supported by Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Banco do Nordeste do Brasil (BNB) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES).

REFERENCES

- [1] H. U. Hebbar, B. Sumana, K.S.M.S. Raghavarao, "Use of reverse micellar systems for the extraction systems for the extraction and purification of bromelain from pineapple wastes. *Bioresour. Technol.* 99: 4896-4902, 2008.
- [2] A. D. Rowan, D. J. Buttle, A. J. Barrett, "The cysteine proteinases of the pineapple plant". *Biochem. J.* 266: 869-875, 1990.
- [3] F. L. G. Lopes, J. B. S. Junior, J. C.C. Santana, R.R. Souza, E. B. Tambourgi, "Utilização de membranas planas na concentração de enzimas bromelinas da polpa de abacaxi (*Ananas comosus* L.)". *Rev. Bras. Prod. Agroind.* 7: 33-38, 2005.
- [4] H. B. Costa, S.G. Delboni, F.S. Fortunato, J.A. Ventura, "Proteolytic activity in stems of 'Vitória', 'Smooth Cayenne' and 'Pérola' pineapple plants." *Acta. Hort.* 822: 239-244, 2009.
- [5] S. Ketnawa, P. Chaiwut, S. Rawdkuen, "Pineapple Wastes: A potential source for Bromelain Extraction". *Food. Bioprod. Process.* 90: 385-391, 2012.
- [6] Amersham Pharmacia Biotech. "Handbook, Protein Purification". 1999.
- [7] H.B. Costa, P.M.B. Fernandes, J.A. Ventura, "Processo de purificação de bromelina, bromelina purificada e usos da enzima purificada". Brazilian Patent, PI10201027122., 2012.
- [8] M.M. Bradford, "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.
- [9] U.K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nat.* 227: 680-685, 1970.
- [10] R. M. Silverstein, F. J. Kezdy, "Characterization of the pineapple stem proteases (Bromelains)". *Arch. Biochem. Biophys.* 167: 678-686, 1975.
- [11] M. Hernandez, M. Chavez, M. Marquez, G. Rodriguez, R. Santos, J. Gonzalez, C. Carvajal, "Processo de obtencion de bromelina a partir de tallos de piña. Cuban Patent C12N9/50, 1997.
- [12] M. Michail, M. Vasiliadou, A. Zotos, "Partial purification and comparison of precipitation techniques of proteolytic enzymes from trout (*Salmo gairdnerii*) heads." *Food. Chem.* 97:50-55, 2006.
- [13] A. C. Cesar, "Análise de Viabilidade Econômica de um Processo de Extração e Purificação da Bromelina do Abacaxi." Campinas, Brazil, Universidade Estadual de Campinas, PhD thesis, 2005.

- [14] J. A. Neto, "Purificação de Enzimas" in: U.A. Lima, E. Aquarone, W. Borzani, W. Schmidell, "Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos." Blucher, São Paulo, 377-390, 2005.
- [15] E. Silveira, M.E. Souza Junior, J.C.C. Santana, A. C. Chaves, A. L. F. Porto, E. B. Tambourgi, "Expanded bed adsorption of bromelain (E.C. 3.4.22.33) from *Ananas comosus* crude extract". *Braz J Chem Eng.* 26: 149-157, 2009.
- [16] T. Murachi, "Bromelain enzymes". in: L. Lorand, "Methods in Enzymology", Academic Press, New York, 475-485, 1976.
- [17] A. Pessoa Junior; B. V. Kilikan, "Purificação de produtos biotecnológicos". São Paulo: Manole, 2005.
- [18] R. V. Devakate, V.V Patil, S.S. Waje, B. N. Thorat, "Purification and drying of bromelain". *Sep. Purif. Technol.* 64: 259-264, 2009.
- [19] H. Cabral, "Isolamento e caracterização bioquímica de uma cisteíno peptidase de Frutos de *Bromelia fastuosa* (Gravatá)". São José do Rio Preto, Brazil, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho-UNESP, Master dissertation, 2001.
- [20] L.P, Hale, P. K. Greer, C. T. Trinh, C.L. James, "Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations". *Int Immunopharmacol.* 5: 783-793, 2005.
- [21] S.S. Gautam, S.K. Mishra, V. Dash, A.M. Goyal, G. Rath, "Comparative study of extraction, purification and estimation of bromelain from stem and fruit of pineapple plant". *Thai J. Pharm. Sci.* 34: 67-76, 2010.

4.3 CAPÍTULO 3– Artigo Submetido

Periódico – Industrial Crops and Products

Fator de Impacto – 2.468

Development of new method for bromelain purification from pineapple: ion exchange plus gel filtration chromatographies

Helber B. Costa^{1,2*}; Patricia M. B. Fernandes¹; Wanderson Romão^{2,3}; José A. Ventura^{1,4**}

¹Núcleo de Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo 29040-090, Vitória, ES, Brasil

²Laboratório de Petrolômica e Química Forense, Departamento de Química, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Avenida Fernando Ferrari, 514, Goiabeiras, Vitória – ES, CEP: 29075-910.

³Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo, 29040-780, Vila Velha, ES, Brasil;

⁴Instituto Capixaba de Pesquisa Assistência Técnica e Extensão Rural - Incaper 29052-010, Vitória, ES, Brasil.

Corresponding authors:

** J.A.V : ventura@incaper.es.gov.br/ + + 55-27-3636-9817

* H.B.C: farmhel@gmail.com / Phone: + + 55-27-3149-0833

Abstract

Bioproducts separation and purification processes are an important segment of the biotechnical industry. Bromelain is an enzyme which has great commercial value and is of wide interest in the pharmaceutical, alimentary, and textile industries, among others. This wide use of bromelain demands the development of viable processes for extraction and purification of this enzyme. The goal of this study was to develop a new method for bromelain purification from the stem residues resulting from agricultural processing of the pineapple plant. Bromelain was purified using two liquid chromatography steps. Use of the methodology which was developed produced an enzyme with a molecular weight of 30 kDa, high recovery of enzymatic activity (89%), and with a purification factor of 16.6, a result superior to the methodologies described in the literature. Moreover, besides its superiority to other methodologies, it can be applied to take advantage of the agricultural and industrial pineapple plant residues.

Keywords: Bromelain; enzyme; purification; chromatography.

1. INTRODUCTION

The isolation and purification of bioproducts are very important processes in the biotechnology industry, representing 80 to 90% of total production costs. Furthermore, the development of simple, viable methods for protein purification has been an essential prerequisite for many advances in biotechnology (Harikrishna et al., 2002; Costa et al., 2009).

Liquid chromatography (LC) is a technique commonly used for protein purification. In liquid chromatography, proteins in solution (mobile phase) are isolated and purified through their interaction with a stationary phase (Cao, 2005). Generally, the products obtained by LC purification are very expensive due to the costs of the materials used in the production process. The development of low-cost LC purification methods has been challenging (Costa et al., 2009).

Proteolytic enzymes, or proteases, are a class of hydrolytic enzymes capable of cleaving the peptide bonds of protein chains and are essential in physiological processes. In addition, proteases are among the most relevant enzymes from an industrial standpoint because of their involvement in several technological applications (Bon et al., 2008).

Bromelain is a proteolytic enzyme belonging to the cysteine peptidase family. This enzyme can be found in the tissues of plants of the Bromeliaceae family, and pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*) is its main source (Rowan et al., 1990; Hebbar and Sumana and Raghvarao, 2008). Bromelain has a number of biotechnological applications, especially in the food, cosmetics and pharmaceutical industries, as well as several clinical applications, such as an antitumor agent, immune response modulator and an enhancer of antibiotic effects and mucolytic and gastrointestinal action. Furthermore, the enzyme has an effect on cardiovascular and

circulatory diseases and may have potential uses in surgical procedures and wound care (Costa et al., 2009).

The worldwide application of bromelain increases the importance of determining a viable extraction and purification method for this enzyme. Such a method may help to minimise losses in the pineapple agribusiness because the agricultural and industrial wastes of pineapple (stems, leaves and crowns) are rich in this enzyme. Usually, this residue is not used and has no appropriate destination (Bardiya and Somaji and Khanna, 1996; Costa et al., 2009). Therefore, the present study presents a new, viable method for the purification of bromelain from pineapple stems using LC as its main technique.

2. METHODS

2.1 Materials

2.1.1 Pineapple wastes

Pineapple wastes from the cv. Vitória were obtained from the Incaper Sooretama Experimental Farm, at Sooretama-ES, Brazil.

2.1.2 Chemicals

All chemicals products used in this study were purchased from Sigma, Merck or GE (USA). HPLC grade chemical products were purchased from Tedia Brazil.

2.2 Crude extract

A known quantity of waste was crushed for five minutes along with an extractor solution (0.4 M H₂SO₄/ 2 mM Na₂SO₄ pH 4.5 at 4°C). The extract was then filtered and centrifuged (Eppendorf centrifuge 5804 R, Germany) at 14,750 x g for 20 min at

4°C, and the supernatant (crude enzyme extract) obtained was used for the following experiments.

2.3 Protein determination

The protein concentrations from enzymatic solutions were determined according to the method described by Bradford (1976) using bovine serum albumin as the standard.

2.4 Bromelain activity

The bromelain activity was determined according to the casein digestion unit (CDU) method, which uses casein as a substrate in the presence of cysteine and EDTA (Murachi, 1976 with modifications). The assays were based on the proteolytic hydrolysis of the casein substrate.

The absorbance of the clear filtrate (solubilised casein) was measured at 280 nm using a spectrophotometer (Thermo Spectronic ® BIOMATE 3, USA). One unit of bromelain activity was defined as 1 µg of tyrosine released in 1 min per mL of sample when casein was hydrolysed under the standard conditions of 37°C and pH 7.0 for 10 min.

The sample analyses were performed against their respective blank solutions. The protein concentration readings were taken in triplicate, and the average value was used for the calculation of the extraction efficiencies. The specific activity, activity recovery (%) and purification fold were estimated by the following equations:

$$\text{Specific activity} = \frac{\text{Proteolytic activity (U/mL)}}{\text{Protein content (mg/mL)}} \quad (1)$$

$$\text{Bromelain recovery (\%)} = \frac{\text{Bromelain activity after purification}}{\text{Bromelain activity of the crude extract}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Purification fold} = \frac{\text{Specific activity after purification}}{\text{Specific activity of the crude extract}} \quad (3)$$

2.5. Ion exchange chromatography

A 25mm ID glass column, 110 mm long was packed with carboxymethyl cellulose (CMC) and equilibrated with four column volumes of $5 \cdot 10^{-3}$ M acetate buffer. Then 10 mL of the crude extract was submitted and remained in contact with the resin for one hour. After, sample was eluted using a 1 M acetate buffer at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹. The fractions were then collected in 4 ml aliquots. The presence of protein was monitored using recording spectrophotometer at 280 nm (Biomate ®), using acetate buffer as blank. The procedures for the estimation of protein content and enzyme activity are described below. Finally, the column was then washed with 2 M NaCl solution was passed through the columns until it was protein free. All procedure was conducted in a refrigerated environment at 4°C.

2.6 Gel filtration chromatography

Fractions from ion exchange chromatography were collected and submitted to gel filtration chromatography. A glass column with a 17.5 mm ID and 200 mm long was packed with Sephadex G-50® and equilibrated with one and half column volumes of acetate buffer. The sample was applied and left in contact with the resin for one hour. The sample was then eluted with 1M acetate buffer at flow rate of 0.7 mL.min⁻¹, and the eluent was collected as previously described. All procedure was conducted in a refrigerated environment at 4°C.

2.7 SDS-PAGE

SDS-PAGE was performed according to the method of Laemmli (1970) using 15% (w/v) polyacrylamide gels. The staining of the gels was performed using Coomassie Brilliant Blue G-250.

2.8 HPLC

A 20 μL aliquot of the sample obtained from the ion exchange and gel filtration chromatography was subjected to analytical high performance liquid chromatography (HPLC) performed on a Shimadzu Prominence (Kyoto, Japan) apparatus with a UV/visible LC-20A detector. The fractions were eluted with a Shimadzu Shim Pack CLC (M) C18 (4.6 mm ID x 250 mm long) column using a linear gradient between TFA/H₂O (1:1000 v/v) and TFA/acetonitrile (1:1000 v/v) over 80 min at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹, and the absorbances were read at 280 nm.

2.9 Mass spectrometry

The protein spot of interest was excised out of the gel (Shevchenko et al., 1996). The spot was washed three times with a washing solution (1:1 v/v 25 mM ammonium carbonate-acetonitrile) at 25°C for 2 h. The washing solution was then removed and the spot was now covered with acetonitrile for 20 min at 25°C. Finally, the acetonitrile was removed and the excess evaporated, thus providing, the drying of the spot. The dehydrated gel particles were then rehydrated for 10 min with 10 μL of digest buffer (25 mM ammonium carbonate) containing 20 ng of trypsin (sequencing grade modified porcine trypsin, Promega, Madison, WI, USA). After, 20 μL of digest buffer were added, and the sample was incubated for 20 h at 37°C. The resulting tryptic peptides were twice extracted with 50 μL of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in 50% v/v

acetonitrile with 20 min sonication. The products from the two extracts were combined, vacuum dried and then dissolved in 0.1% TFA in 50% v/v acetonitrile.

The matrix (10 mg/mL CHCA (α -ciano-4-hydroxycinnamic acid) in 0.1% TFA and 50% v/v acetonitrile) and the sample (1:1 v/v) were spotted and cocrystallised on a target plate. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight/time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF MS, model 4700 Explorer Proteomics Analyser, Applied Biosystem®, USA) has been applied to Peptide Mass Fingerprint (PMF) and peptide sequencing. For MALDI-MS/MS measurements, N₂ was used as collision gas in the collision cell at 2.8×10^{-6} torr. Trypsin autolysis peptides of masses 842.5 and 2211.1 and calibration mixtures 1 and 2 (Sequazyme Peptide Mass Standard kit, PerSeptive Biosystems®, Foster City, CA, USA) were used, respectively, as internal and external standards in both the MALDI MS and MALDI MS/MS procedures.

For database searching, ppw files were submitted to the Mascot search engine using Daemon 2.1.0 (Matrix Science: <http://www.matrixscience.com>) on a Mascot server version 2.2.1. The data were searched against the latest version of the public non-redundant protein database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), downloaded on August 2008, with a mass accuracy of 15 ppm for the parent ion (MS) and 0.2 Da for the fragment ions (MALDI MS/MS).

The search was constrained to tryptic peptides with a maximum of one missed cleavage. The carbamidomethylation of cysteine was considered a fixed modification, whereas the oxidation of methionine residues was considered as a variable modification. An initial list of proteins was generated and formed the basis for further analysis. A “positive list” was generated by considering only those proteins that

contained at least one unique peptide (minimum 10 aa) with a Mascot score above 67 (p-value<0.05).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Ion exchange chromatography

Bromelain purification with carboxymethylcellulose (CMC) exhibited a purification factor of 3.01, with 93% recovery of the proteolytic activity. No activity was detected after the washing flow. The ion exchange chromatography of bromelain resulted in a prominent peak in the sixth fraction (Figure 1). The specific activities of the applied crude extract and the sixth eluted fraction were 23.07 and 69.50 U/mg protein, respectively.

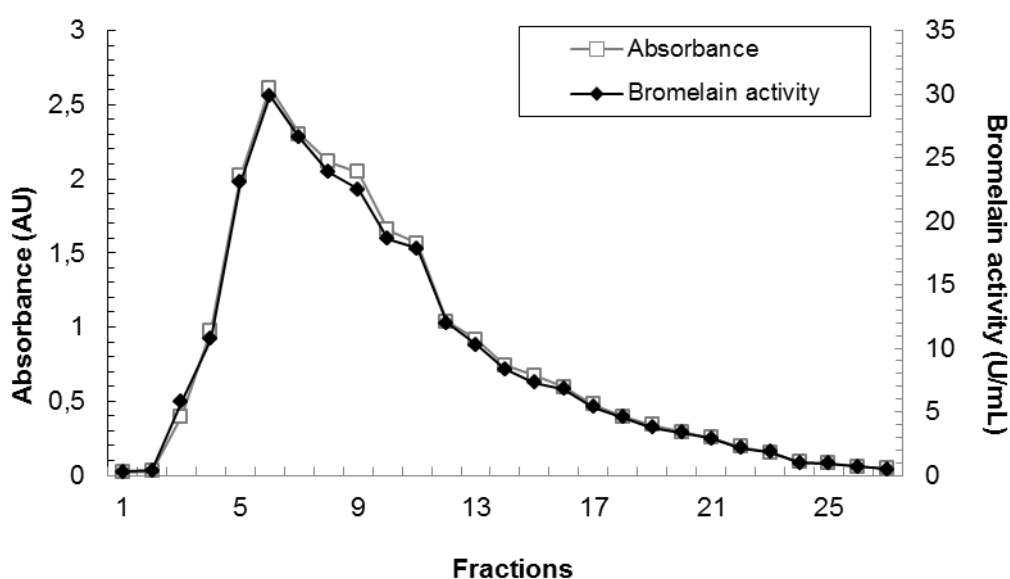


Figure 1- Ion exchange chromatographic purification profile for bromelain from pineapple stems.

We observed a higher bromelain activity than those reported for existing methodologies of ion exchange chromatography. This activity is due to the use of 1

M acetate buffer in this step. Costa (2010), compared different buffers for the maintenance of bromelain, and noted that this buffer at pH 4.5 contributed to bromelain activity. Moreover, previous works have indicated that differences in the ion chromatography resin are important to bromelain activity (Devakate et al., 2009; Costa, 2010).

3.2 Gel filtration chromatography

The fractions obtained by ion exchange chromatography (fractions 3 – 22) were pooled and subjected to molecular exclusion chromatography using Sephadex G-50 resin, and a total of 51 fractions were collected (Figure 2). The specific activity of bromelain was 389.02 U/mg, whereas that the proteolytic activity was 89 % of recovery with a purification factor of 16.86.

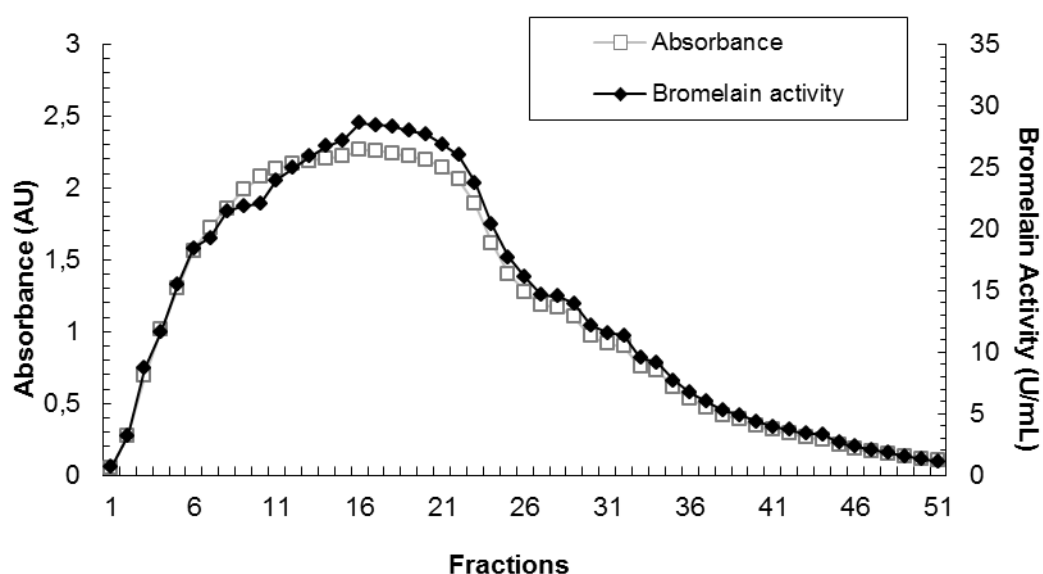


Figure 2- Gel filtration chromatographic purification profile for bromelain from pineapple stems after ion exchange chromatography.

The coupling of CMC resin with the Sephadex® G-50 resin is a powerful analytical chromatography method to obtain bromelain in its pure form. Suh et al. (1992) purified bromelain from pineapple fruit and stem until homogeneity using gel filtration chromatography, obtaining a yield of only 23 % of activity.

Hernandez et al. (2005) reported a purification method for bromelain similar to our study. Authors conducted the bromelain purification however using opposite treatment: they performed the gel filtration followed by ion exchange chromatography. The gel-filtration resin used was Sephadex® G-100, yielding 87.81% activity. The second purification step was used the CMC, which the yield of bromelain activity decreased to 41.15%.

The Sephadex® G-50 is cheaper than Sephadex® G-100 (reduction of 50 % of cost), becoming the purification process of bromelain economically viable. Additionally, the purification methodology developed presents a higher yield of proteolytic activity.

3.3 SDS-PAGE

In the SDS-PAGE analysis, the molecular weight of bromelain was estimated as 30 kDa, and predicted by Gautam et al. (2010) and other previous studies. Bromelain may not be completely pure when the extract is eluted only with ion exchange, as suggested by the double gel band in the 30 kDa region (Lane 1 - Figure 3). The result of the gel filtration purification of bromelain was confirmed by the SDS-PAGE result, in which only one band can be observed in the 30 kDa region (Lane 2 - Figure 3).

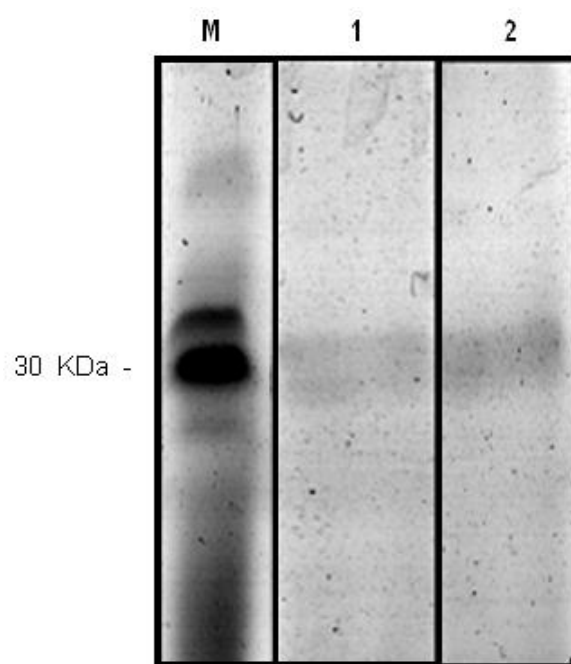


Figure 3- SDS-PAGE analysis of ion exchange (Lane 1) and gel filtration (Lane 2) chromatography. (M – Molecular Weight Marker).

3.4 HPLC

Aliquots from the same fractions used for the preparation of the SDS-PAGE gels were then prepared for HPLC. The HPLC analysis corroborated with the SDS-PAGE results. The reversed phase chromatography confirmed the presence of two peaks in the ion exchange chromatogram (Figure 4a) and only one protein (Peak 1) in the gel filtration chromatogram, which was eluted in the first 10 min (Figure 4b).

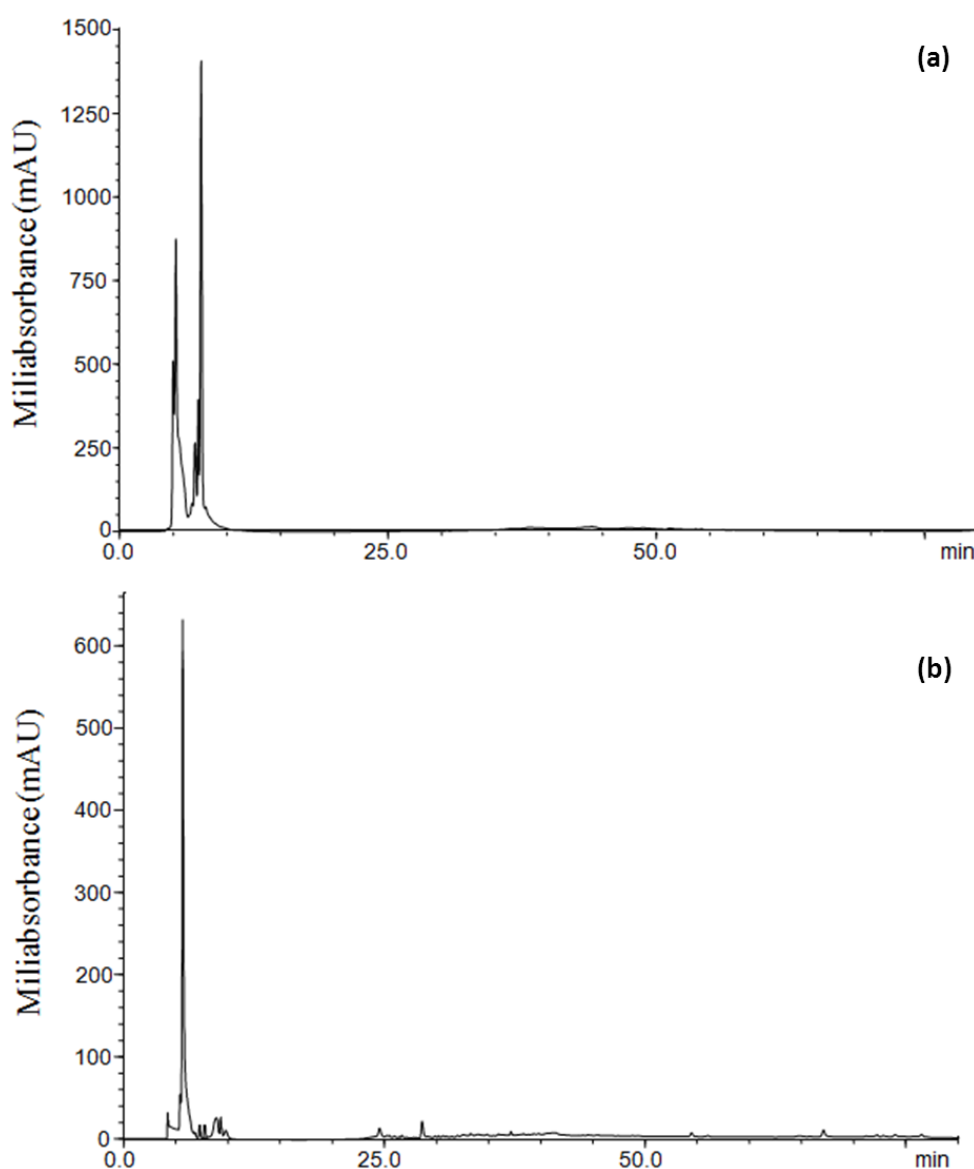


Figure 4- HPLC chromatograms obtained from the fraction with the highest proteolytic activity in the C18 column using a gradient of 0-80% water-acetonitrile at a flow of 0.5 mL/min for 80 min (a) Ion exchange chromatogram (b) gel filtration chromatogram

Bromelain is a protein with polar characteristics, as indicated by the peak appearing during the first few minutes when water is the main solvent in the non polar column (C-18), causing it to be rapidly eluted. Napper et al. (1994), in a comparison of pineapple proteases, ascribed the polarity of bromelain mainly to its contents of the amino acids lysine and arginine, which are present in larger amounts in comparison with other proteases.

3.6 Mass spectrometry

The SDS-PAGE previously shown (Figure 3, lane 2) was excised and trypsinised to obtain a PMF. The MALDI-TOF MS confirmed the purity of the bromelain (Figure 5a) from identification of 10 more abundant peptides with m/z values of 951.44, 963.44, 1000.49, 1016.48, 1032.48, 1068.52, 1103.52, 1526.70, 1566.73 and 1584.75. Among signals identified, the ions of m/z 951 and 1584 were submitted to MALDI-MS/MS experiments for determination of fragmentation profile and sequencing (Figure 5b and 5c). The Mascot program has been used for the MALDI-MS/MS data, thus providing, the most likely sequence for the peptides of m/z 951 (Probable sequence: WGEAGYIR) and 1584 (Probable sequence: TNGVPNSAYITGYAR).

The NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) database analysis of the two peptides identified a FBSB precursor [*Ananas comosus*] with the access code gi2463584, which has a 95-100% identity with bromelain. Additionally, the SwissProt (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) database was also used, confirming again the purity of the bromelain as an identity of 95-100% between bromelain and a peptide with the access code BROM2_ANACO.

The MSDB database was also used to analyse the two peptides. The peptide with the m/z 951 showed high homology with ananain, identified as an AN8 precursor.

Rowan et al. (1990) described the presence of four main proteases in pineapple (*Ananas comosus*): fruit bromelain, stem bromelain, ananain and comosain.

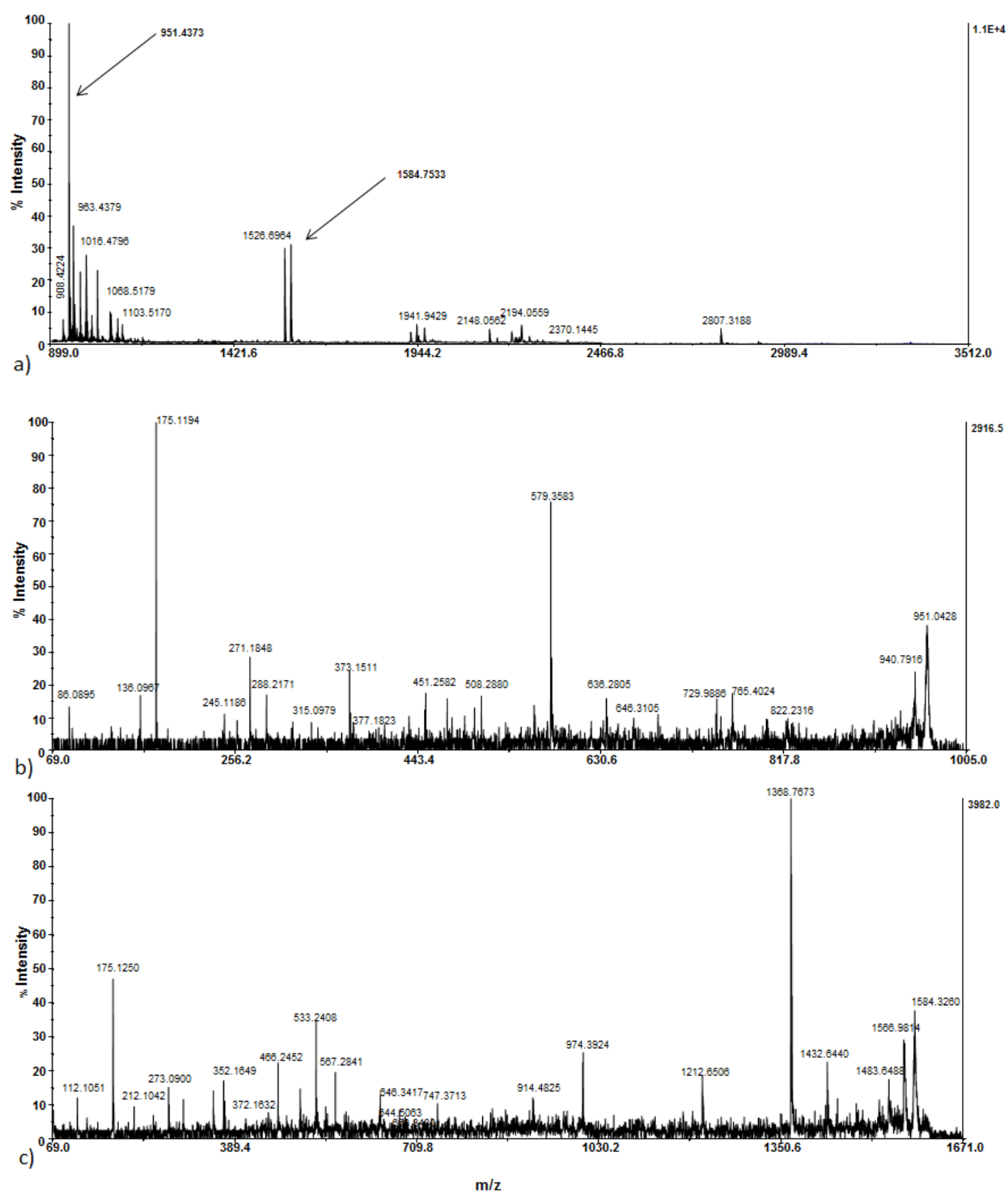


Figure 5 – (a) MALDI-TOF MS spectrum from bromelain purified (b) MALDI TOF MS/MS from peptide m/z 951 (c) MALDI TOF MS/MS from peptide m/z 1584.

Ananain shows a 77% amino acid sequence identity with bromelain (Lee et al., 1997). This peptide (m/z 951) is present at the N-terminus region of bromelain, which is a portion identical to that of other cysteine proteases, as it comprises mainly the

region of the catalytic site. If we align only one fragment of the two proteins (bromelain and ananain- see bellow), the peptides differ by only one amino acid: bromelain has an alanine (A), whereas the ananain has a glycine (G).

| | |
|------------------------|--------------|
| Stem bromelain | WGAKWGEAGYIR |
| Ananain | WGAGWGEGGYIR |
| Peptide <i>m/z</i> 951 | WGEAGYIR |

As proteases of the same family, the proteins were expected to share several identical regions in their primary sequences, and some peptides would have a high identity with ananain or other proteases. The most likely sequence identified for the peptide mass of *m/z* 951 is the bromelain.

3.7 Purification process

The bromelain purification method using carboxymethylcellulose was able to purify the compound approximately 3.01 times the level in the crude extract, and the Sephadex® column purified the compound approximately 16.86 times (Table 2).

The results indicate that, depending on the destination of the bromelain, the process can be stopped after the first purification step using ion exchange chromatography. This method is possible because the CMC purified the compound 3.01 times the level in the crude extract (Table 1), with this result confirmed by the SDS-PAGE and HPLC results.

Table 1 – Yield in total protein, proteolytic activity, specif activity and purification factor for each bromelain purification step

| Steps | Volume (mL) | Total protein (mg/mL) | Proteolytic activity (U/mL) | Specific activity (U/mg) | PF ¹ |
|---------------|-------------|-----------------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------|
| Crude extract | 8 | 1.77 | 40.84 | 23.07 | 1 |
| CMC | 100 | 0.20 | 13.90 | 69.50 | 3.01 |
| Sephadex | 5 | 0.093 | 36.34 | 390.75 | 16.93 |

¹PF – Purification Factor

In many cases, the commercial use of bromelain in the food, cosmetics, and nutritional, medicinal and pharmacological supplement industries (Ketnawa and Chaiwut and Rawdkuen, 2012) does not require a high purity bromelain enzyme preparation. The process described in the present study enables producers to choose the desired level of bromelain purity, thereby further reducing the costs of the production process.

Proteolytic activity is the main parameter for quality control, and the bromelain purified by the process demonstrated in the present study had a proteolytic activity yield of 89%, which is higher than that obtained from current purification processes.

4. CONCLUSIONS

The bromelain purification method of the present study employs two LC steps: ion exchange chromatography (carboxymethylcellulose), followed by gel filtration chromatography (Sephadex® G-50). The purified bromelain has a molecular weight of approximately 30 kDa and is of high purity, and the purification method yields a higher proteolytic activity value (89%) at a lower cost than the existing methodologies. Therefore, the method demonstrated in the present study can be used to transform the agricultural and industrial wastes of pineapple crop into a product with high added value and significant biotechnological interest.

Acknowledgments

The authors thank Clair Barboza from Instituto Capixaba de Pesquisa Assistência Técnica e Extensão Rural. Authors thanks too Dr. Silas Rodrigues Pessini and Instituto de Bioquímica Médica of Federal University of Rio de Janeiro and Hemostase and poison laboratory (IBqM). This work was supported by Financiadora

de Estudos e Projetos (FINEP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Banco do Nordeste do Brasil (BNB) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES).

5. REFERENCES

- Bardiya, N., Somayaji, D., Khanna, S., 1996. Biomethanation of banana peel and pineapple waste. *Bioresour. Technol.* 8, 73–76.
- Bradford, M.M.A., 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Bon, E. P. S., Ferrara, M. A., Corvo, M. L., 2008. *Enzimas em biotecnologia. Produção Aplicações e Mercado*, first ed. Interciência, Rio de Janeiro.
- Cao, L., 2005. Protein separation with ion Exchange membrane chromatography. Worcester, United States, Worcester Polytechnic Institute, Master dissertation.
- Costa, H. B. Extração e purificação de bromelina do caule do abacaxizeiro (*Ananas comosus* var. *comosus*) cv. Vitória. Brazil, Federal University of Espírito Santo, Master dissertation.
- Costa, H.B., Delboni, S.G., Fortunato, F.S. Ventura, J.A., 2009. Proteolytic activity in stems of 'Vitoria', 'Smooth Cayenne' and 'Perola' pineapple plants. *Act. Hort.* 822, 239-244.
- Devakate, R. V., Patil, V. V., Waje, S. S., Thorat, B.N., 2009. Purification and drying of bromelain. *Sep. Purif. Technol.* 64, 259-264.
- Hebbar, H. U., Sumana, B., Raghavarao, K.S.M.S., 2008. Use of reverse micellar systems for the extraction and purification of bromelain from pineapple wastes. *Bioresour. Technol.* 99, 4896-4902.
- Harikrishna, S., Srinivas, N.D., Raghavarao, K.S.M.S., Karanth, N.G., 2002. Reverse micellar extraction for downstream processing of proteins/enzymes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 75, 119–183.
- Hernández, M., Carvajal, C., Marquez, M., Báez, R., Morris, H., Santos, R., Chávez, M. A., 2005. Obtención de preparados enzimáticos a partir de tallos de Pina (*Ananas comosus*) com potencialidades de uso em la biotecnología y la medicina *Revista CENIC Ciências Biológicas.* 36, 1-12.
- Ketnawa, S., Chaiwut, P., Rawdkuen, S., 2012. Pineapple Wastes: A potential source for bromelain extraction. *Food. Bioprod. Process.* 90, 385-391.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nat.* 227, 680-685.
- Lee, K.L., Albee, K. L., Bernasconi, R. J., Edmunds, T., 1997. Complete amino acid sequence of ananain and a comparison with stem bromelain and other plant cysteine proteases. *Biochem. J.* 327, 199-202.
- Murachi, T., Bromelain enzymes, 1976, in: Lorand, L. (Ed.), *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, pp. 475–485.
- Napper, A. D., Bennett, S.P., Borowski, M., Holdridge, M. B., Leonard, M. J., Rogers, E. E., Duan, Y., Laursen, R. A.; Reinhold, B., Shame, S. L., 1994. Purification and

- characterization of multiple forms of the pineapple-stem-derived cysteine proteinases ananain and comosain. *Biochem. J.* 301, 727-735.
- Rowan, A. D., Buttle, D. J., Barrett, A. J., 1990. The cysteine proteinases of the pineapple plant. *Biochem. J.* 266, 869-875.
- Suh, H. J., Lee, H., Cho, H.Y., Yang, H.B., 1992. Purification and characterization of bromelain isolated from pineapple. *Hanguk Nonghwa Hakhoe.* 35, 300-307.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm O., Mann, M., 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem. Germany*, v. 68, p. 850-858, 1996.

4.4 Capítulo 4– Artigo Submetido

Periódico –Food and Bioproducts Processing

Fator de Impacto – 1.855

Kinetic characterization of bromelain obtained from pineapple plant residues (*Ananas comosus* var. *comosus*) cv. Vitória

Helber B. Costa^{1‡}; Patricia M. B. Fernandes¹; José A. Ventura^{1,2†}

¹Núcleo de Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo 29040-090,
Vitória, ES, Brasil

²Instituto Capixaba de Pesquisa Assistência Técnica e Extensão Rural - Incaper
29052-010, Vitória, ES, Brasil.

Corresponding authors:

† J.A.V : ventura@incaper.es.gov.br / + + 55-27-3636-9817

‡ H.B.C: farmhel@gmail.com / Phone: + + 55-27-3149-0833

Abstract

Bromelain is a protease present in the pineapple that has numerous biotechnological interests. New varieties of pineapple that have promise for agricultural improvements and improved commercial acceptance are an object of current research and some are now being introduced to the market. Evaluation of the kinetic characteristics of the bromelain in these newly launched varieties with as an objective, optimizing its separation and purification, is a good strategy for aggregating value in the pineapple sector of agribusiness. The goal of this work was to accomplish a kinetic characterization of the bromelain from cv. Vitória, a new variety resistant to fusariosis. Bromelain obtained from agricultural residues of this new variety, by chromatography, in two steps, pre-purified and purified, was studied. The results show that the pre-purified extract of bromelain obtained from the first step of purification contains two proteolytic enzymes. Moreover, the purified bromelain presented its optimal proteolytic activity at pH 8 and 60 °C, thusly having characteristics similar to those of the bromelain obtained from varieties currently used as a source of bromelain. The results demonstrate that cv. Vitória represents a good source of bromelain coupled with its agricultural and commercial benefits related to disease resistance.

Keywords: Bromelain; kinetic characterization; new source of obtention

1.INTRODUCTION

Proteases are enzymes of great industrial interest and yield about 3 billion dollars in sales annually (Leary et al. 2009). They represent about 60 % of the total amount of enzymes commercialized in the entire world. Among the most well known proteases having high value and with good commercial acceptance are papaín from the papaya (*Carica papaya*), ficin of the fig (*Ficus spp.*) and pineapple bromelain (*Ananas comosus* var. *comosus*) (Muntari et. al, 2012)

Considering this, one realizes that one of the great challenges in this market is in realizing cost reduction for the production of these enzymes. The separation process and subsequent bioproduct purification is then, a very important segment of the biotechnical industry since the separation and purification procedure represents 80 to 90 % of the production cost. This way, the development of simple and economically viable methodologies for protein purification has become an essential prerequisite for many of the advances in biotechnology (Harikrishna et al. 2002; Costa and Fernandes and Ventura, 2012).

Bromelain belongs to the group of proteolytic enzymes which constitute the cysteine-peptidase family, which are described as playing a role in the processes of ripening and senescence of fruits (Neuteboom and Matsumoto and Christopher, 2009). This enzyme is of great interest for the alimentary, cosmetic and pharmaceutical industries, with many clinical applications, such as, an antitumoral agent, as an immunomodulator, potentiation of antibiotics, a mucolytic, and for its digestive action, besides having application in the treatment of cardiovascular and circulatory diseases, as well as being used in surgical procedures and the treatment of wounds (Rowan et al., 1990; Hebbar and Sumana and Raghavarao, 2008; Costa et al., 2009).

Bromelain can be found in tissues of the plant family Bromeliaceae, being a byproduct of the fruit processing and related agricultural residues of the pineapple plant (*Ananas comosus* var. *comosus*), especially the stem, its main source (Rabelo and Tambourgi and Pessoa Junior, 2004). Moreover, the pineapple is the only fruit in which the plant has relatively high concentrations of proteases in the mature state.

Considering that pineapple culture is based on a restricted number of genotypes, cultivar diversification is desirable. In this context, researches are frequently being performed to evaluate cultivars and genotypes of the pineapple plant with the objective of selecting plants resistant to the main diseases, which are productive and have fruit of acceptable commercial quality.

In this context we find the cultivar Vitória, a new variety of pineapple, resistant to the fusariosis, a disease caused by the fungi *Fusarium subglutinans* f.sp. *ananas* (sin: *Fusarium guttiforme*) which can cause losses from 30 to 40 % of the fruit. This cultivar presents similar or superior agronomical characteristics to those of the cultivars Pérola and Smooth Cayenne, industry standards for fruit production and as a source of bromelain these being however, susceptible to fusariosis. The use of resistant cultivars has been pointed out as the more efficient and economic control measure for plant diseases, especially for cultivars such as the pineapple, which is usually planted by low income farmers who lack agricultural technological knowledge (Ventura and Zambolim, 2002; Ventura, et. al., 2009).

Previous works have elucidated the biochemical and structural mechanisms of cv. Vitória resistance. (Aquiye et al., 2010) in comparison with the existing varieties. There are however, no reports regarding the kinetic characterization of the bromelain in cv. Vitória. The present work proposes accomplishing the kinetic characterization of the bromelain obtained from cv. Vitória residues to evaluate the potential of this

new variety as a source of bromelain.

2 METHODS

2.1 Pineapple wastes

Pineapple wastes of cv. Vitória were obtained from Incaper Sooretama Experimental Farm, Sooretama-ES, Brazil.

2.2 Chemicals

All chemical products were purchased from Sigma, Merck or GE.

2.3 Crude extract

A determined quantity of wastes was crushed for five minutes in an extraction solution (0.4 M H₂SO₄/2 mM Na₂SO₄ pH 4,5 at 4°C). After that the extract was filtrated and centrifuged (Eppendorf centrifuges 5804 R, Germany) at 14,750 x g for 20 min at 4°C and the supernatant (crude enzyme extract) obtained was used in the subsequent experiments.

2.4 Bromelain purification from pineapple stems

Bromelain was purified with a new methodology developed. The crude extract was submitted to ion exchange chromatography. A 25mm ID glass column, 110 mm long was packed with caboxymethy-celulose and equilibrated with four column volumes of $5 \cdot 10^{-3}$ M acetate buffer. Then 10 mL of the crude extract was submitted and allowed to remain in contact with the resin for one hour. After, sample was eluted using a 1 M acetate buffer at a flow rate of 0.5 mL. min⁻¹. The fractions were then collected in 4 ml aliquots. The presence of protein was monitored using recording

spectrophotometer at 280 nm (Biomate ®), using acetate buffer as blank . The procedures for the estimation of protein content and enzyme activity are described below. Finally, finishing the elution the column was then washed with 2 M NaCl solution was passed through the columns until it was protein free. Aliquots from ion exchange chromatography were collected and submitted to gel filtration chromatography. A glass column with a 17.5 mm ID and 200 mm long was packed with Sephadex G-50® and equilibrated with one and half column volumes of acetate buffer. The sample was applied and left in contact with the resin for one hour. The sample was then eluted with 1M acetate buffer at flow rate of 0.7 mL.min⁻¹, and the eluent was collected as previously described. The entire procedure was conducted in a refrigerated environment at 4°C. (Costa and Fernandes and Ventura, 2012).

To confirm the purification of bromelain the proteolytically active fractions in both chromatographies were analyzed by RP-HPLC (Shimadzu Prominence LC – 20AT). Fractions were eluted from a Shimadzu Shim Pack CLC (M) C18 (4.6 mm x 250 mm) column using the linear gradient between TFA/H₂O (1:1000 v/v) and TFA/acetonitrile (1:1000 v/v) over 80 min at a flow rate of 0.5 mL.min⁻¹ and with the absorbance being read at 280 nm. The purity of the bromelain was also checked by SDS-Page electrophoresis using to 15% polyacrylamide gel and coomassie blue staining.

2.5 Proteolytic activity of the pre purified and purified bromelain

The proteolytic activity was determined according to the casein digestion unit (CDU) method, which uses casein as a substrate in the presence of cysteine and EDTA (Murachi, 1976 with modifications). The assays were based on the proteolytic hydrolysis of the casein substrate.

The absorbance of the clear filtrate (solubilised casein) was measured at 280 nm using a spectrophotometer (Thermo Spectronic ® BIOMATE 3). One unit of bromelain activity was defined as 1 µg of tyrosine released in 1 min per mL of sample when casein was hydrolysed under the standard conditions of 37°C and pH 7.0 for 10 min. Results were expressed as a recovery percentage of bromelain activity.

2.6 Optimum pH for pre-purified and purified bromelain

The optimum pH for bromelain activity was determined at 37°C by incubating the enzyme obtained from CMC and Sephadex at different pHs (6.0; 6.5; 7.0; 7.5; 8.0; 8.5; 9.0) for 10 min. Phosphate buffer was used for the range from 6.0 to 7.5, TRIS-HCl buffer for pH 6.0 to 8.0.

2.7 Optimum temperature for pre-purified and purified bromelain.

The optimum temperature for bromelain activity was determined by incubating the enzyme obtained from CMC and Sephadex for 10 min at different temperatures from 40 to 0°C (at regular intervals of 10°C).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Bromelain purification

SDS Page and HPLC were the methodologies applied for the bromelain purification confirmation and, which served, as a consequence, as the basis for validation of the subsequent studies to determine the pH and temperature range for optimal enzyme activity. SDS Page and HPLC revealed that ion exchange chromatography is not adequate for complete purification of the bromelain, yielding instead a pre-purified enzyme (Figure 1a).

Investigating these methodologies has shown, indeed, that use of both chromatographic procedures is essential for obtaining protein with a high degree of purity (Costa and Ventura and Fernandes, 2012) since there is evidence of only one peak for the purified protein while there were two peaks for the pre purified protein in HPLC. And, in SDS-Page's analysis, the molecular weight of the bromelain was estimated to be 30 kDa as predicted by Gautan et al. 2010 (Figure 1b).

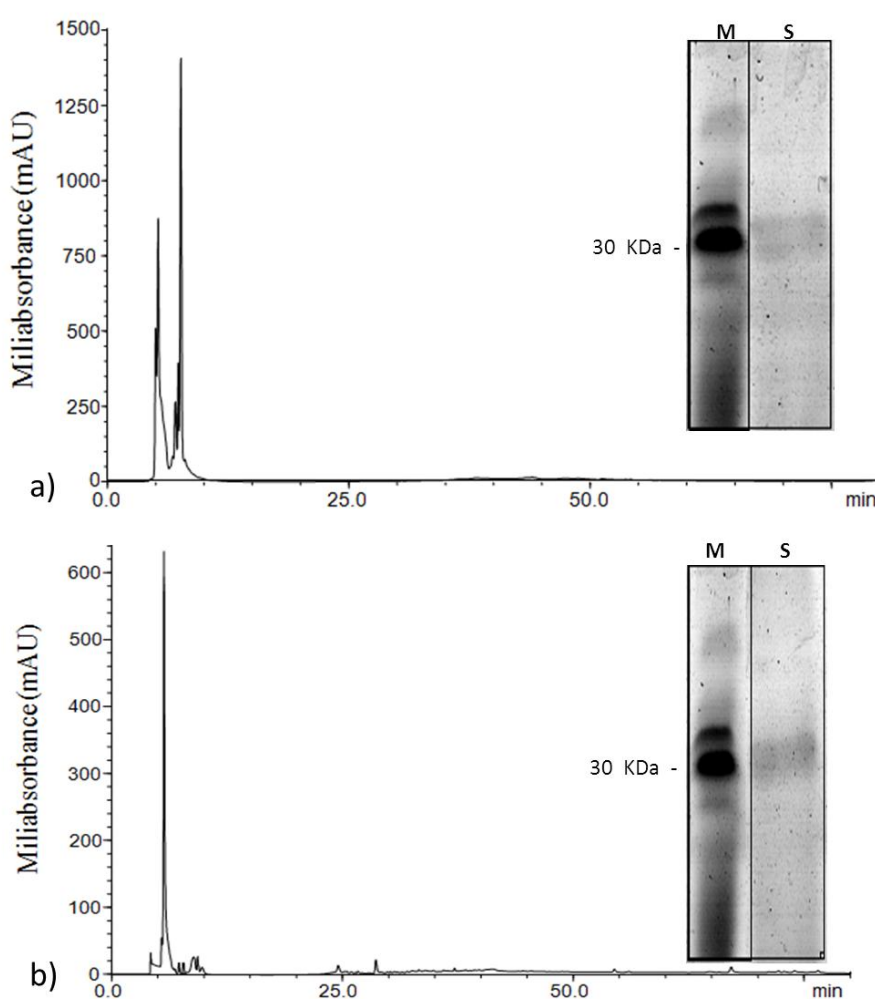


Figure 1- (a) HPLC and SDS-PAGE of pre-purified bromelain by ion exchange chromatography (b) HPLC and SDS-PAGE of purified bromelain by gel filtration

3.2 Optimum pH

The pre-purified bromelain of cv. Vitória presented optimal activity in the pH 8, in Tris buffer (Figure 2).

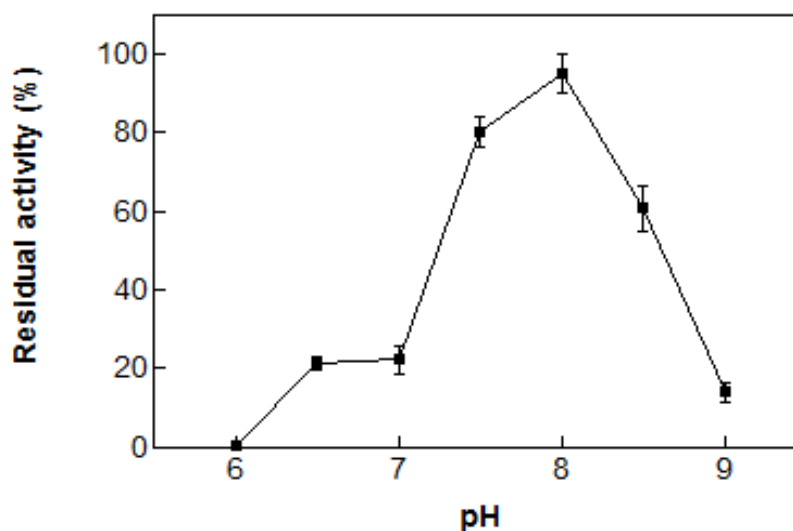


Figure 2 - Optimal pH of pre-purified bromelain activity

One of the first parameters to be established for a recently discovered enzyme is its activity profile in function of pH. This practice is frequently applied in the case of the endopeptidases of plants. (Wagner, 1986).

The pH for optimal enzyme activity is related to the chemical characteristics of the substrate, because the reaction velocity of an enzyme is altered by the effect of pH on the substrate ionization state (Franca-Santos et al, 2007).

Other factors that can influence the optimal pH of an enzyme are: its concentration, pH of the extraction medium, the type of buffer solution used and the presence of reducing agents (Franca-Santos et al, 2007)

According to Rowan et al. (1990) all endopeptidases of the pineapple exhibit a wide profile of optimal pH activity near neutral pH.

Even though evaluation of the enzyme, pre-purified by ion exchange chromatography, indicates that there is more than one enzyme in this fraction, the maximal proteolytic activity was in only one pH (pH 8) (Figure 2). That can be explained by the existence of two or more proteolytic enzymes present in that fraction

having the same pH for optimal activity.

Moreover, bromelain is a mixture of several proteases which differ in their action on different substrates, in their susceptibility in oxidation and reduction and in the pH at which they hydrolyze substrates more rapidly (França-Santos et al, 2007; Maurer, 2001) Thusly, in the fraction from this stage of purification there can be two proteases of bromelain present, with the same optimal pH, since the proteolytic activity is elevated and in SDS-Page both present nearly the same molecular weight (Figure 1a). Maurer (2001) previously described proteases of bromelain that have this characteristic.

Bromelain purified from cv. Vitória obtained after the complete purification process, also had its optimal pH for enzymatic activity in pH 8, in Tris buffer. (Figure 3).

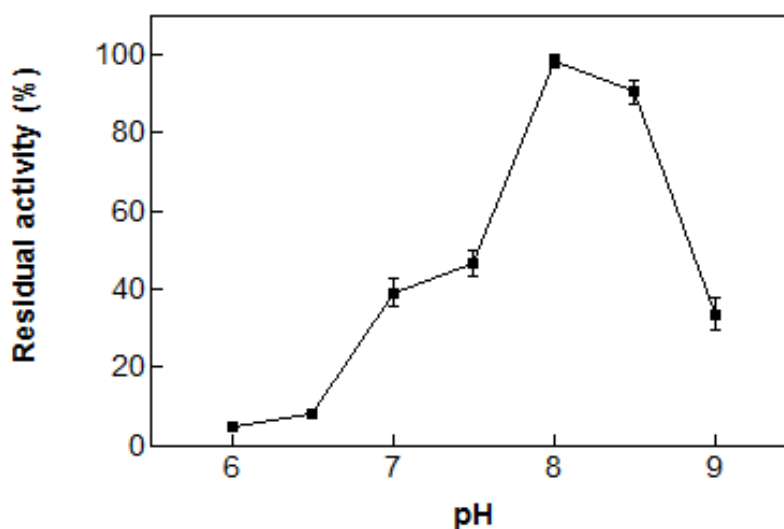


Figure 3- Optimal pH of purified bromelain activity

Bromelain obtained with this new purification process has an optimal pH value within the expected range. According to Minami and Doi and Hata (1971); the optimal pH range for bromelain when using casein as substrate is between 7 and 8,5. Mahmood and Saleemuddin (2007) also describe the optimal pH of native bromelain as being 8

at the temperature values given in the methodology used in this work.

3.4 Optimum temperature

Pre-purified bromelain obtained from the CMC process attained maximal activity at the temperature of 60°C. The elevation of the proteolytic activity (Figure 4) that presented at the temperature of 40 °C also deserves our attention.

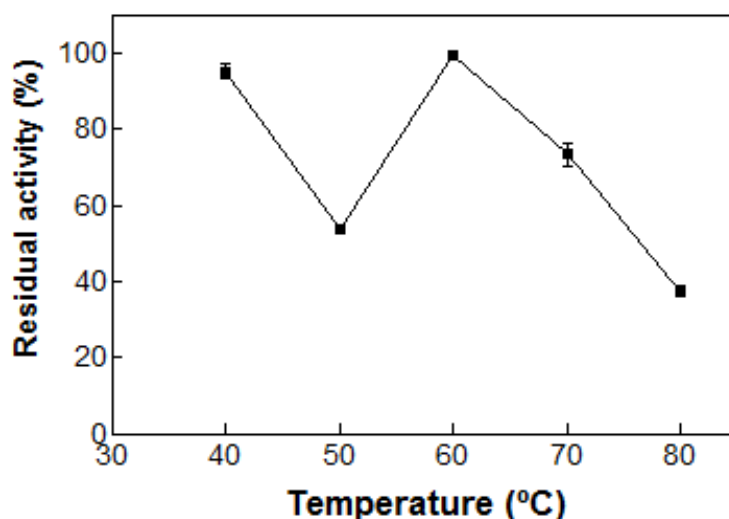


Figure 4- Optimal temperature of pre-purified bromelain activity

The activity increase consider contrasting with the behavior at different pHs at different temperatures (40 and 60°C) confirms the existence of more than one enzyme with proteolytic activity in the pre-purified bromelain extract.

The optimal activity temperature study of bromelain is important not only for the kinetic characterization of the enzyme purified by this new process but also because knowledge of the optimal temperature allows determining the best storage temperature to be used for bromelain to maintain its catalytic activity since heat is a denaturing agent. As well as pH variation from the ideal, temperature elevation

causes losses denaturing protein and consequently affecting the enzymatic activity factor (Franca-Santos et al., 2007).

Regarding the purified enzyme, values of optimal temperature to 60°C (Figure 5) can be seen.

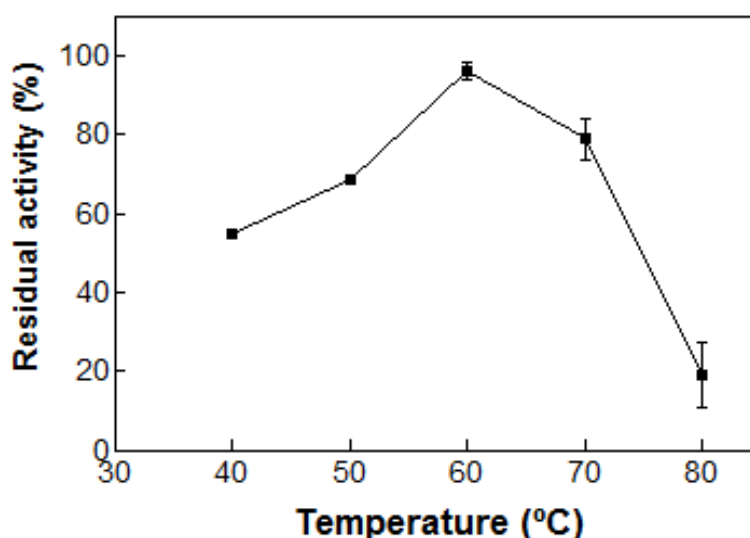


Figure 5 - Optimal temperature of purified bromelain activity

There are various bromelain optimal temperature values described in the literature; 25 °C (Hatano and Tanokura and Takahashi; 1998, Bhattacharya and Bhattacharyya, 2009), 37 °C, (Rasheedi and Haq and Khan , 2003); 45°C (Bala et. al., 2012); 60° C (Suh et al., 1992; Mahmood and Saleemudin, 2007 ; Khatoon and Younus and Saleemuddin, 2007; Ketnawa and Chaiwut and Rawdkuen, 2012) 62,5 °C (Ko and Kang, 1990). The explanation of this divergence of values can be that the bromelain used in these studies is, in fact, a complex of proteolytic enzymes, with the optimal temperature depending on the isoforms of the bromelain isolated. Moreover, some other factors should be taken into consideration concerning this divergence found in the literature, such as, the kind of substrate used in the activity

experiment, and the duration of enzyme contact with the substrate. For example, with regard to the type of substrate, depending on the substrate used the enzyme activity can be more or less affected by temperature variation which can influence the optimal temperature determination (França-Santos et al., 2007).

Extreme temperatures (10°C and 100°C) also were evaluated in the bromelain activity in the two situations of pre purified and purified, in both cases, the enzyme was already completely denatured, without proteolytic activity, or at insignificant values of activity (data no show).

Thus the kinetic characteristics regarding the cv. Vitória bromelain proteolytic activity are similar to the characteristics found in the varieties nowadays used in bromelain production, presenting optimum values of activity in the range of pH 8 and 60° C. Considering that all the bromelain uses having industrial interest are based on its proteolytic activity the enzyme purified in present work demonstrates that this new variety can be used as a good source for bromelain production (França-Santos et al., 2007).

4.CONCLUSION

This kinetic characterization enabled identification of cv. Vitória as a good source of bromelain, since the enzyme studied presents similar characteristics to that present in the varieties currently used as its source. Moreover, the results reaffirm that new varieties can aggregate value to the pineapple sector of agribusiness, benefiting the entire production chain because cv. Vitória, besides having resistance to fusariosis, which prevents a potential 30 to 40% loss in agricultural production, yields by-products which can be effectively used as a source of bromelain by taking advantage of biotechnical improvements in the purification process.

Acknowledgments

The authors thank Clair Barboza from Capixaba Research Institute, Technical Assistance and Rural Extension – Incaper. This work was supported by Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Banco do Nordeste do Brasil (BNB) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES).

REFERENCES

- Aquije, G. M. F. V., Zorzal, P. B., Buss, D. S., Ventura, J. A., Fernandes, P. M. B., Fernandes, A. A. R., 2010. Cell wall alterations in the leaves of fusariosis-resistant and susceptible pineapple cultivars. *Plant. Cell. Rep.* 29, 1109-1117.
- Bala, M., Ismail, N. A., Mel, M., Jami, M.S., Salleh, H. M., Amid, A., 2012. Bromelain Production: Current trends and perspective. *Arch. Sci.* 65, 369-399.
- Brattacharya, R., Brattacharya, D., 2009. Resistance of bromelain to SDS binding. *Biochim. Biophys. Acta.* 4, 698 – 708.
- Costa, H. B., Delboni, S. G., Fortunato, F. S., Ventura, J. A., 2009. Proteolytic activity in stems of 'Vitória', 'Smooth Cayenne' and 'Pérola' pineapple plants. *Acta. Hort.* 822, 239-244.
- Costa, H.B., Fernandes, P.M.B., Ventura, J.A., 2012. Processo de purificação de bromelina, bromelina purificada e usos da enzima purificada. PI10201027122.
- França-Santos, A., Alves, R. S., Leite, N. S., Fernandes, R. P. M., 2009. Estudos bioquímicos da enzima bromelina do *Ananas comosus* (abacaxi). *Rev. Scientia Plena.* 5, 1-6.
- Harikrishna, S., Srinivas, N.D., Raghavarao, K.S.M.S., Karanth, N.G., 2002. Reverse micellar extraction for downstream processing of proteins/enzymes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 75, 119–183.
- Hatano, K., Tanokura, M.; Takahashi, K., 1998. The amino acid sequences of isoforms of the bromelain inhibitor from pineapple stem. *J. Biochem.* 2, 457-461.
- Hebbar, H. U., Sumana, B., Raghavarao, K.S.M.S., 2008. Use of reverse micellar systems for the extraction and purification of bromelain from pineapple wastes. *Bioresour. Technol.* 99, 4896-4902.
- Ketnawa, S.; Chaiwut, P.; Rawdkuen, S., 2012. Pineapple Wastes: A potential source for bromelain extraction. *Food. Bioprod. Process.* 90,385-391.
- Khatoon, H. Younus, H.; Saleemuddin, M., 2007. Stem Bromelain: An enzyme that naturally facilitates oriented immobilization. *Protein Pept. Lett.* 14, 233- 236.
- Ko, Y.H., Kang, Y.J., 1990. Isolation and partial characterization of proteolytic enzymes from stems of pineapples cultivated in Cheju Island. *Nonmunjip-Cheju Taehakkyo.* 31, 137-142.
- Leary, D., Vierros, M., Hamon, G., Arico, S., Monagle, C., 2009. Marine genetic resources: a review of scientific and commercial interest. *Mar. Policy.* 33, 183-194.

- Mahmood, R., Saleemuddin, M., 2007. Additional stabilization of stem bromelain coupled to a thermosensitive polymer by uniform orientation and using polyclonal antibodies. *Biochemistry*. 72, 307-312.
- Maurer, H. R., 2001. Bromelain: Biochemistry, pharmacology and medical use. *Cell. Mol. Life. Sci.* 58, 1234 – 1245.
- Minami, Y., Doi, E., Hata, T., 1971. Fractionation, purification, and some properties of proteolytic enzymes from stem bromelain. *Agric. Biol. Chem.* 35, 1419-1430.
- Muntari, B. Amid, A.; Mel, M.; Jami, M.S.; Salleh, H.M., 2012. Recombinant bromelain production in *Escherichia coli*: process optimization in shake flask culture by response surface methodology. *AMB Express*. 15, 2-9.
- Murachi, T., Neurath, H., 1976. Fractionation and specificity studies on Stem Bromelain. *J. Biol. Chem.* 235, 99-107.
- Neuteboom, L. W., Matsumoto, K. O., Christopher, D. A., 2009. An Extend AE-Rich N-Terminal trunk in secreted pineapple cystatin enhances inhibition of fruit bromelain and is posttranslationally removed during ripening. *Plant Physiol.* 151, 515-527.
- Rabelo, A.P.B., Tambourgi, E.B., Pessoa Junior, A., 2004. Bromelain partitioning in two-phase aqueous systems containing PEO-PPO-PEO block copolymers, *J Chromatogr B.* 807, 61-68.
- Rasheedi, S., Haq, S. K., Khan, R. H., 2003. Guanidine hydrochloride denaturation of glycosylated and deglycosylated stem bromelain. *Biochemistry (Mosc)*. 68, 1097-1100.
- Rowan, A. D., Buttle, D. J., Barrett, A. J., 1990. The cysteine proteinases of the pineapple plant. *Biochem. J.* 266, 869-875.
- Suh, H. J., Lee, H., Cho, H.Y., Yang, H.B., 1992. Purification and characterization of bromelain isolated from pineapple. *Hanguk Nonghwa Hakhoe.* 35, 300-307.
- Ventura, J. A., Cabral, J. R. S., Matos, A. P. , Costa, H., 2009. 'Vitória': new pineapple cultivar resistant to fusariose. *Acta Hort.* 822, 51-54.
- Ventura, J.A., Zambolim, L., 2002. Controle das doenças do abacaxizeiro, in: Zambolim, L. et al.(Eds.), *Controle de doenças de plantas fruteiras*, Viçosa, pp. 445-509.
- Wagner, F. W., 1986. Assessment of methodology for the purification, characterization, and measurement of proteases, in: Dalling, M. J. *Plant (Ed.) Proteolytic Enzymes*, Florida

5.CONCLUSÕES

Nos frutos em diferentes estádios de maturação demonstrou-se que a cv. Pérola apresentou maior teor protéico e maior atividade proteolítica diferindo significativamente ($P < 0,05$) da cv. Vitória. A atividade específica de bromelina apresentou o mesmo perfil para ambas as cultivares nos diferentes estádios de maturação do fruto, porém os valores encontrados na cv. Vitória foram superiores em relação à cv. Pérola, com diferenças significativas ($P < 0,05$) no estágio 4.

Na comparação dos parâmetros químicos entre as cultivares a cv. Vitória apresentou características semelhantes ou superiores quando comparados a cv. Pérola em todos os estádios de maturação dos frutos. Na cv. Vitória foi considerado o estágio 4 como o melhor ponto de colheita para consumo desse fruto. Neste estágio, além de apresentar características químicas adequadas para o consumo, os valores elevados de atividade específica da bromelina poderão trazer mais benefícios à saúde do consumidor.

Os maiores valores de atividade específica foram encontrados na cv. Vitória, o que indica a possibilidade de purificação da bromelina a partir dos frutos no estágio 4 de maturação.

Com a ampla aceitação comercial da cv. Vitória quando comparada a cv. Pérola é possível afirmar que exista um alto potencial de disponibilidade de matéria prima para a purificação e obtenção de bromelina a partir dos seus resíduos agrícolas.

Entre as soluções de extração de bromelina utilizadas a partir de resíduos da cv. Vitória, a solução de H_2SO_4/Na_2SO_4 pH 4,5, rendeu maiores valores de proteínas totais e atividade proteolítica o que conseqüentemente elevou os valores de atividade específica de bromelina (32,08 U/mg), valor esse, superior ao encontrado nas metodologias atualmente existentes. A utilização do Na_2SO_4 permitiu uma proteção do sítio sulfidrilico da enzima evitando que ela sofresse autólise e perdesse sua atividade.

Na comparação entre as técnicas de precipitação fracionada para purificação de bromelina obtidos a partir de resíduos da cv. Vitória, a precipitação por sulfato de amônio foi a melhor para as etapas iniciais de purificação de bromelina por manter os valores de atividade proteolítica elevados. As frações 20-50% e 50-75% de saturação, renderam os maiores valores de atividade proteolítica com 88,57 % e 98,42 % de recuperação, respectivamente.

A comparação entre as resinas de troca iônica utilizadas mostrou que a resina que melhor manteve a atividade proteolítica (89.31%) e ainda manteve a integridade da enzima foi a CM-Celulose, sendo essa de melhor escolha para purificar bromelina.

Foi desenvolvido um novo processo de purificação de bromelina (Número de depósito no INPI: PI10201027122, data de depósito: 23/10/2012) obtendo uma enzima com alto grau de pureza utilizando duas técnicas de cromatografia líquida: troca iônica (utilizando carboximetilcelulose) e gel filtração (utilizando sephadex G-50). A metodologia purifica bromelina com maiores valores de atividade proteolítica (89%) e, ainda a metodologia apresenta maior viabilidade no processo laboratorial frente às metodologias atualmente descritas na literatura.

Considerando ainda que nem todos os usos industriais da bromelina exigem que a enzima esteja com elevado grau de pureza, dependendo do fim a que se destina não há a necessidade de execução de todas as etapas envolvidas no processo de purificação apresentado. Com isso é possível obter a partir desse novo processo também, uma bromelina pré-purificada. Isso faz com que, o custo de sua obtenção fique ainda menor.

A caracterização cinética da bromelina pré-purificada obtida até a etapa da utilização de carboximetilcelulose apresenta pH ótimo 8 e temperatura ótima de 40 e 60°C. A bromelina purificada apresenta pH ótimo de 8 e temperatura ótima de 60°C. Assim, é possível afirmar que a bromelina obtida a partir do processo de purificação desenvolvido apresenta características químicas e bioquímicas semelhantes às bromelinas descritas na literatura e comercializadas atualmente. É possível afirmar

ainda, que os resíduos de abacaxizeiro da cv. Vitória representam uma boa fonte de obtenção de bromelina.

Estima-se que a partir de 1 kg de resíduo do abacaxi, é possível obter aproximadamente 267 mg de bromelina pré purificada e 124 mg de bromelina purificada. Pelos dados disponíveis é possível produzir aproximadamente 21,36 kg de bromelina pré purificada e aproximadamente 9,92 kg de bromelina pura, obtidos por hectare de abacaxi cultivado. Considerando que 1 (um) g de bromelina atualmente é importada a aproximadamente R\$ 25,00 (vinte e cinco reais), pode-se gerar 248 mil reais por hectare de abacaxi cultivado a partir dos resíduos culturais que atualmente não têm aproveitamento.

6.REFERENCIAS

AEHLE, W. **Enzymes in Industry: Production and Applications**, 3. ed. Weinheim: Wiley, 2007.

AICHELE, K.; BUBEL, M.; DEUBEL, G.; POHLEMANN, T.; OBERRINGER, M. Bromelain down-regulates myofibroblast differentiation in an *in vitro* wound healing assay. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. Berlin, v. 386, n. 10, p. 853-863, 2013.

AMMERSHAM PHARMACIA BIOTECH. **Handbook, Protein Purification**. New Jersey: AMMERSHAM, 1999, 94 p. Disponível em <http://www.biochem.uiowa.edu/donelson/Database%20items/protein_purification_handbook.pdf> Acesso em: 15 out. 2013.

ARAVIND, G.; BHOWMIK, D.; DURAIVEL, S.; HARISH, G. Traditional and medicinal uses of *Carica papaya*. **Journal of Medicinal Plants Studies**. Nova Deli, v. 1; n. 1 p. 7-15, 2013.

ARUMUGAM, A.; PONNUSAMI, V. Pineapple fruit bromelain recover using recycable functionalized ordered mesoporous sílica synthesized from sugarcane leaf ash. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. São Paulo, v. 30, n. 3, p. 477- 48, 2013.

BABU, B. R.; RASTOGI, N.K.; RAGHAYARAO, K. S.M.S. Liquid-liquid extraction of bromelain and polypheno oxidase usin aqueous two-phase system. **Chemical Engineering and Processing**. Amsterdam, v. 47, p. 83-89, 2008.

BALA, M.; ISMAIL, N. A.; MEL, M.; JAMED, M.S.; MOHD, H.; AZURA AMID, S. Bromelain Production: Current trends and perspective. **Archives dès Sciences**. Geneva. v. 65, n. 11, p. 369-399, 2012.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**. 4. ed. Berlim, 2009.

BERTEVELLO, L. C. **Estudo do processo de recuperação e separação de bromelina utilizando sistema de duas fases aquosas em micro-coluna de extração**. 2001. 105 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) –Programa de Pos Graduacao em Engenharia Quimica, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP, 2001.

BHATTACHARYYA, B. K. Bromelain: An Overview. **Natural Product Radiance**. Nova Deli, v. 7. n. 4, p. 359-363, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde RENISUS. Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS. Espécies vegetais. 2009. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso em: 28 set. 2013

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia.** Produção Aplicações e Mercado. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

BORRACINI, H. M. P. **Estudo do processo de extração da bromelina por micelas reversas em sistema descontínuo.** Campinas 2006. 84p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

CABRAL, J. R. S.; SOUZA, J. S.; FERREIRA, F. R. **Variabilidade genética e melhoramento do abacaxi. Recursos Genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste Brasileiro.** Petrolina, 1999. Disponível em : <<http://www.cpatas.embrapa.br/catalogo/livrorg/>> Acesso em: 16. ago. 2013.

CABRAL, H. **Isolamento e caracterização bioquímica de uma cisteíno peptidase de Frutos de Bromelia fastuosa (Gravatá).** 2001. 126 f. Dissertação. (Mestrado em Biofísica Molecular). Programa de Pós Graduação em Biofísica Molecular , Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho-UNESP, 2001.

CAMPESE, G. M. **Extração e recuperação da bromelina em sistemas de duas Fases Aquosas PEG4000 – POLICAJU.** 2004. 101 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP, 2004.

CESAR, A. C. W. **Otimização dos parâmetros líquido-líquido em duas fases aquosas na recuperação da bromelina presente no abacaxi.** Campinas, 2000. 79 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP.

CESAR, A. C. W. **Análise de viabilidade econômica de um processo de extração e purificação da bromelina do abacaxi.** Campinas, 2005. 111 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP, 2005.

CHANDLER, D. S.; MYNOTT, T. L. Bromelain protects piglets from diarrhoea caused by oral challenge with K88 positive enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Gut**. Londres, v.43, n.2, p. 196-202, 1998.

COELHO, D. F.; SILVEIRA, E.; PESSOA JUNIOR, A.; TAMBOURGI, E.B. Bromelain purification through unconventional aqueous two-phase system (PEG/ammonium sulfate). **Bioprocess and biosystems engineering**. Berlin, v. 36, n.2, p. 185-192, 2013.

CORZO, C.A.; KRZYSZTOF, W.K.N.; WELTI-CHANES, J. Pineapple fruit bromelain affinity to different protein substrates. **Food Chemistry**. Barkin, v. 133, n. 3, p.631-635, 2011.

COSTA, H. B. **Extração e purificação de bromelina do caule do abacaxizeiro (*Ananas comosus* var. *comosus*) cv. Vitória.** Vitória, 2010. 110 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Espírito Santo – UFES.

COSTA, H. B. ; DELBONI, S. G. ; FORTUNATO, F. S. ; VENTURA, J. A. . Proteolytic activity in stems of 'Vitória', 'Smooth Cayenne' and 'Pérola' pineapple plants. **Acta Horticulturae**. Honolulu, v. 822, p. 239-244, 2009.

COSTA, H. B. ; FERNANDES, P. M. B.; VENTURA, J. A. Extração, Purificação parcial e Comparação de duas técnicas de precipitação de enzimas proteolíticas do abacaxizeiro. In: XX Congresso Brasileiro de Fruticultura 54th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture, 1.,2008, Vitória. **Anais...** Vitória: Incaper, 2008. Disponível em: <http://200.137.78.15/cd_XXCBF/paginas/Biotecnologia/20080726_101835.pdf> Acesso em: 15. Ago. 2013

COSTA, H.B.; FERNANDES, P.M.B; VENTURA, J.A. Processo de purificação de bromelina, bromelina purificada e usos da enzima purificada. PI10201027122, INPI, 2012.

DEVAKATE, R. V.; PATIL, V. V.; WAJE, S. S. ; THORAT, B.N. Purification and drying of bromelain. **Separation and Purification Technology**. India, v.64 , p. 259-264, 2009.

DOKO, B.; BASSANI, V.; CASADEBAIG, J.; CAVAILLES, L.; JACOB, M. Preparation of proteolytic enzyme extracts from *Ananas comosus* L. Merr. fruit juice using semi permeable membrane, ammonium sulfate extraction, centrifugation and freeze-drying processes. **International Immunopharmacology**. Durham, USA, v.4, n. 5, p. 783–793, 2005.

DUBEY, V. K.; PANDE, M.; SINGH, B. K.; JAGANNADHAM, M. V. Papain-like proteases applications of their inhibitors. **African Journal of Biotechnology**. Kenya, v.6, n.9, p. 1077-1086, 2007

FAJARDO, N. C. **Processo de obtenção da bromelina a partir do caule do abacaxi**. Cuba: Centro de bioplantas, ÚNICA, 1998. Disponível em: < www.cuba.cu/ciencia/acc/tecnicas2002_resumen.htm >. Acesso em: 24 ago 2013.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à Análise Fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. UFRGS: Florianópolis, 2004. p. 229-245.

FATIBELLO, O. F.; VIEIRA, I. C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova**. São Paulo, v.25, n.3, p. 45-464, 2002. Disponível em: < quimicanova.sbq.org.br/qnol/2002/vol25n3/-12k >. Acesso em: 28 ago. 2013

FEIJOO-SIOTA, L.; VILLA, T.G. Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. **Food and Bioprocess Technology**. Nova York, v. 4; p. 1066-1088, 2011

FRANÇA-SANTOS, A.; ALVES, R. S.; LEITE, N. S.; FERNANDES; R. P. M. Estudos bioquímicos da enzima bromelina do *Ananas comosus* (abacaxi). **Revista Scientia Plena**. Aracajú, v. 5, n. 11, p. 1-6, 2009.

FREEDONIA®. Enzymes: Specialty & Industrial, Forecasts to 2006 & 2011, Study # 1574, 2002.

FREIMAN, L. O.; SABAA, A. U. O. Determinação de proteína total e escore de aminoácidos de bromelinas extraídas dos resíduos do abacaxizeiro (*Ananas comosus*). (L.) Merril. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas. v.19, n.2, p.170-173, 1999.

GAUTAM, S.S.; MISHRA, S. K. ; DASH, V. ;GOYAL , A.M.; RATH, G. Comparative study of extraction, purification and estimation of bromelain from stem and fruit of pineapple plant Thai **Journal of Pharmaceutical Sciences**. Washington v. 34 , 67-76, 2010

GOMES, J. A.; VENTURA, J. A.; ALVES, F. L.; ARLEU, R. J.; ROCHA, M. A. M.; SALGADO, J. S. **Recomendações técnicas para o cultivo do abacaxizeiro**. Vitória: INCAPER. 2003.

GONZALEZ-RABADE, N.; BADILLO-CORONA, J.A. ARANDA-BARRADA, J.S.; OLIVER-SALVADOR, M.C.O. Production of plant proteases *in vivo* and *in vitro*- a review. **Biotechnology Advances**. Nova York, v.29, n. 6, 2011.

GUPTA, P.; MAQBOOL, T. SALEEMUDDIN, M. Oriented immobilization of stem bromelain via the lone histidine on a metal affinity support. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 45, p. 78-83, 2007.

HALE, L.P.; GREER, P.K.; TRINH, C.T.; JAMES, C. L. Proteinase Activity and Stability of natural bromelain preparations. **International Immunopharmacology**. Durham, USA. v.5, p.783-793, 2005.

HARDIN, B. Improving ethanol yield corn. **Agricultural Research**. Washington, v.44, n.10, p. 8, 1996.

HARRACH, T.; ECKERT, K.; MAURER, H.R.; MACHLEIDT, I.; MACHLEIDT, W.; NUCK, R. Isolation and Characterization of Two Forms of an Acidic Bromelain Stem Proteinase. **Journal of Chemical Protein**. Nova York, v. 17, n. 4, p. 351-361, 1998.

HATANO, K., TANOKURA, M.; TAKAHASHI, K. The amino acid sequences of isoforms of the bromelain inhibitor from pineapple stem. **Journal of Biochemistry**. Tokyo, v.2, p. 457-461, 1998.

HEBBAR, H.U.; HEMAVATHI, A. B.; SUMANA, B.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Reverse micellar extraction of bromelain from pineapple (*Ananas comosus* L. merryl) waste: scale-up, reverse micelles characterization and mass transfer studies.**Separation Science and Technology**. Nova York, v. 46, n. 10, p. 1656-1664, 2011.

HEBBAR, U. H.; SUMANA, B.; HEMAVATHI, A. B.; RAGHAVARAO K. S. M. S Separation and purification of bromelain by reverse micellar extraction coupled

ultrafiltration and comparative studies with other methods. **Food and Bioprocess Technology**. Nova York, v.5, p. 1010–1018, 2012.

HEBBAR, H.U.; SUMANA, B.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Use of reverse micellar systems for the extraction and purification of bromelain from pineapple wastes. **Bioresource Technology**. Essex, v. 9, 4896–4902, 2008.

HEMAVATHI, A.B.; HEBBAR, H.U.; RAGHAVARAO K. S. M. S. Reverse micellar extraction of bromelain from *Ananas comosus* L. Merrill. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. Oxford, v. 82, n. 11, p. 985-992, 2007.

HERNÁNDEZ, M.; CARVAJAL, C.; MARQUEZ, M.; BÁEZ, R.; MORRIS, H.; SANTOS, R. ; CHÁVEZ, M. A. Obtención de preparados enzimáticos a partir de tallos de Pina (*Ananas comosus*) com potencialidades de uso em la biotecnología y la medicina. **Revista CENIC Ciências Biológicas**. Cuba, v.3. n. especial., 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Rio de Janeiro: IBGE, 2012. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso: 26 out. 2013..

JULIANO, L. N. **Preparação, caracterização e utilização de membranas poliméricas no reuso da água da indústria têxtil**. Santa Catarina, 2004. 155 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC.

JUNG, Y.; CHOI, C.; PARK, J.; KANG, H.; CHOI, J.; NOU, I.; LEE, S. Y.; KANG, K. Overexpression of the pineapple fruit bromelain gene (BAA) in transgenic Chinese cabbage (*Brassica rapa*) results in enhanced resistance to bacterial soft rot. **Electronic Journal of Biotechnology**. Chile, v. 11. n. 1,2008.

JUTAMONGKON, R.; CHAROENREIN, S. Effect of temperature on the stability of fruit bromelain from Smooth Cayenne pineapple. **Kasetsart Journal Natural Science**. Bangkok, v. 44 : 943 – 948, 2010.

KELLY, G. S. Bromelain: a literature review and discussion of its therapeutic applications. **Alternative Medicine Review**. Dover, v.1, n.4, p.243-257, 1996.

KETNAWA, S.; CHAIWUT, P.; RAWDKUEN, S. Aqueous Two-phase Extraction of bromelain from Pineapple Peels (‘Phu Lae’ cultiv.) and Its Biochemical Properties. **Food Science and Biotechnology**. Coréia do Sul, v. 20, n. 5, p. 1219- 1226, 2011a.

KETNAWA, S.; CHAIWUT, P.; RAWDKUEN, S. Extraction of bromelain from pineapple peels. **Food Science and Technology International**. Nova York, v. 4, n. 17, p 395-402, 2011b.

KETNAWA, S.; CHAIWUT, P.; RAWDKUEN, S. Pineapple Wastes: A potential source for bromelain extraction. **Food and Bioproducts Processing**, Rugby, v. 90, n. 3, 2012.

KETNAWA, S.; RAWDKUEN, S.; CHAIWUT, P. Two phase partitioning and collagen hydrolysis of bromelain from pineapple peel *Nang Lae* cultivar. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 52, p. 205–211, 2010.

KUMAR, S.; HEMAVATHI, A. B.; HEBBAR, H. U. Affinity based reverse micellar extraction and purification of bromelain from pineapple (*Ananas comosus* L. Merrill) waste. **Process Biochemistry**, Londres, v. 46, p. 1216–1220, 2011.

KHATOON, H. YOUNUS, H.; SALEEMUDDIN, M. Stem Bromelain: An enzyme that naturally facilitates oriented immobilization. **Protein Peptide Letters**. Hilversum, v. 14, n. 3, p. 233- 236, 2007.

KONNO, K.; HIRAYAMA, C.; NAKAMURA, M.; TATEISHI, K.; TAMURA, Y.; HATTORI, M.; KOHNO, K. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. **The Plant Journal**. Oxford, v.37, p. 370-378, 2004.

LAROCCA, M.; ROSSANO, R.; SANTAMARIA, M.; RICCIO, P. Analysis of pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.] fruit proteinases by 2-D zymography and direct identification of the major zymographic spots by mass spectrometry. **Food Chemistry**. Barking, v.123, p.1334–1342, 2010.

LEARY, D.; VIERROS, M.; HAMON, G. ; ARICO, S.; MONAGLE, C. Marine genetic resources: a review of scientific and commercial interest. **Marine Policy**. Oxford, v. 33 , p. 183-194, 2009.

LEITE, A. P.; OLIVEIRA, B. G. R. B.; SOARES, M. F.; BARROCAS, D. L. R. Uso e efetividade da papaína no processo de cicatrização de feridas: uma revisão sistemática. **Revista Gaúcha de Enfermagem**. Porto Alegre, v. 33, n. 3, p. 198-207, 2012 .

LEITE, N. S.; LIMA, A. A. B.; SANTANA, J. C. C.; LOPES, F. L. G. L.; LEDO, A.S.; TAMBOURGI, E. B.; SOUZA, R. R. Determination of optimal condition to obtain the bromelain from pineapple plants produced by micropropagation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. Curitiba, v. 55, n. 5, p. 647-652, 2012.

LIANG, H.Y.; LI, M.; SHI, M.; LIAO, A.P.; WU, S.R.C. Study on the stability of fruit bromelain. **Advanced Materials Research**. Zuerich, v. 421, p. 19-22, 2011.

LOPES, F. L. G.; JUNIOR, J. B. S.; SANTANA, J. C. C.; SOUZA, R. R. ; TAMBOURGI, E. B. Utilização de membranas planas na concentração de enzimas bromelinas da polpa de abacaxi (*Ananas comosus* L.) **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. Campina Grande, v.7, n.1, p.33-38, 2005

LOPES, F.L.G; JUNIOR, J.B.S.; SOUZA, R.R.; EHRHARDT, D.D.; SANTANA, J.C.C.; TAMBOURGI, E.B. Concentration by membrane separation processes of a medicinal product obtained from pineapple pulp. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. Curitiba ,v. 52, n. 2, p. 457-464, 2009.

MAHMOOD, R.; SALEEMUDIN, M. Additional stabilization of stem bromelain coupled to a thermosensitive polymer orientation and using polyclonal antibodies. **Biochemistry**. Moscou, v. 72, n. 3, p. 307-312, 2007.

MARTINS, Z. J.; NISIDA, A. L. A. C.; BALDINI, V. L. S. Processamento: produtos e subprodutos, características e utilização. In: **Instituto de Tecnologia de Alimentos. Abacaxi, cultura, matéria prima, processamento e aspectos econômicos**. 2. ed. Campinas: ITAL, 1992. p. 165 – 219.

MAURER, H. R. Bromelain: Biochemistry, pharmacology and medical use. **Cellular and molecular life science**. Alemanha, v. 58, p. 1234 – 1245. 2001.

MINAMI, Y.; DOI, E.; HATA, T. Fractination, purification, and some properties of proteolytic enzymes from stem bromelain. **Agricultural and Biological Chemistry** Tokyo, v. 35, p. 1419-1430, 1971.

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR. SECRETARIA DE COMÉRCIO EXTERIOR (MDIC/SECEX). Dados sobre o comércio exterior brasileiro. Disponível em: <http://www.aliceweb.desenvolvimento.gov.br>. Acesso em: 08. Jan. 2014.

MOHR, T.; DESSER, L. Plant proteolytic enzyme papain abrogates angiogenic activation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) *in vitro*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. Londres, v. 13, n. 1, p. 231-239, 2013.

MONTEIRO V.N. ; SILVA; R.N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**. Anápolis, v.3; n.5; p. 9-23, 2009.

MUNTARI, B. AMID, A.; MEL, M.; JAMI, M.S.; SALLEH, H.M. Recombinant bromelain production in *Escherichia coli*: process optimization in shake flask culture by response surface methodology. **AMB Express**. Heidelberg, v. 15, n. 2, p. 2-9, 2012.

MYNOTT, T. L.; GUANDALINI, S.; RAIMONDI, F.; FASANO, A. Bromelain prevents secretion caused by *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* enterotoxins in rabbit ileum *in vitro*. **Gastroenterology**. Baltimore, v. 113, n.1, p. 175-184, 1997.

NADZIRAH, K. Z.; ZAINAL, S.; NORIHAM, A.; NORMAH, I. Efficacy of selected purification techniques for bromelain. **International Food Research Journal**. Selangor, v. 20, n.1, p. 43-4, 2013.

NETO, J. A. Purificação de Enzimas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. 1. ed. v. 3. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, p. 377-390. 2005.

NEUTEBOOM, L. W. ; MATSUMOTO, K. O. ; CHRISTOPHER, D. A. An Extend AE-Rich N-Terminal trunk in secreted pineapple cystatin enhances inhibition of fruit bromelain and is posttranslationally removed during ripening. **Plant Physiology**. Lancaster, v. 151. p. 515-527. 2009.

OLIVEIRA, M. A.; COUTO, F. A. A. Uso dos restos culturais do abacaxizeiro na alimentação bovina. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 130, p. 76-78, 1985.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS JUNIOR, A. F. Atividade enzimática de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central crescendo em diferentes níveis de acidez. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 26, n. 1, 2006.

PARK; Y.K. Produção de Enzimas industriais de origem animal. . In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. 1. ed. v. 3. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, p. 363-367. 2001

PAVAN, R.; JAIN, S.; SHRADDHA, KUMAR, A. Properties and therapeutic application of bromelain. **Biotechnology Research International**. Nova York, v. 2012, n. 2012.

PEDREIRA, C. M. S. **Enzimas proteolíticas de plantas usadas no amaciamento da carne: bromelina, ficina e papaína**. São Paulo: AgriPoint, 2001. Disponível em: <www.beefpoint.com.br/bn/sic/artigo.asp?id_artigo=1857>. Acesso em: 15 ago. 2013.

PELICANO, R.; STRONA, S.; SIMONDI, D.; REGGIANI, S.; PALLAVICINO, F.; SQUAZZINI, C.; BONAGURA, A. G.; RIZETTO, M.; ASTEGIANO, M. Benefit of dietary integrators for treating functional dyspepsia: a prospective pilot study. **Minerva gastroenterologica e dietologica**. Torino, v. 55, n.3, p. 227-235, 2009.

PESSOA JUNIOR, A. ; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. São Paulo: Manole, 2005.

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

PORTO, T.S.; MEDEIROS E SILVA, G. M. ; PORTO, C.S. , CAVALCANTI, M. T. H.; NETO, B. B.; LIMA-FILHO, J. L.; CONVERTI, A.; PORTO, A. L. F.; PESSOA JUNIOR, A. Liquid-liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system. *Chemical Engineering and Processing: Processing intensification*. Amsterdam, v. 47, p. 71-721, 2008.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. Washington, v. 62, n. 3, p. 597–635, 1998.

RASHEEDI, S.; HAQ, S. K.; KHAN, R. H. Guanidine hydrochloride denaturation of glycosylated and deglycosylated stem bromelain. **Biochemistry**, Moscou, v. 68, p.1097-1100, 2003.

SALAMPESSY, J.; PHILIPS, M.; SENEWEERA, S.; KAILASAPATHY, K. Release of antimicrobial peptides through bromelain hydrolysis of leatherjacket (*Meuschenia sp.*) insoluble proteins. **Food Chemistry**. Barkin, v. 120, p. 556-560, 2010.

SANT'ANNA JÚNIOR, G. L. Produção de Enzimas Microbianas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. 1. ed. v. 3. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2005. p. 351-362.

SANTOS, R. L. A. **Controle e monitoramento em tempo real de um processo de precipitação de bromelina utilizando comunicação digital *Fieldbus***, Campinas 2006. 101 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP.

SARTORELLO, M. C. **Estudo do processo de extração da bromelina em sistema descontínuo água, polietilenoglicol e polissacarídeo da goma do cajueiro**. Campinas, 2004. 84 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP.

SILVESTRE, M.P.C.; CARREIRA, R.L.; SILVA, M.R.; CORGOSINHO, F.C.; MONTEIRO, M.R.P.; MORAIS, H.A. Effect of pH and temperature on the activity of enzymatic extracts from pineapple peel. **Food and Bioprocess Technology**. Nova York, v. 5, n. 5, p. 1066-1088, 2012.

SIQUEIRA, T. V. **A cultura do mamão: desempenho no período 1961-2002**. Rio de Janeiro: BNDES, setorial, n. 18, p- 91-148, 2003. Disponível em: < www.bndes.gov.br/conhecimento/bnset/set1803a.pdf> Acesso em : 15. ago. 2013.

SUH, H.J.; LEE, H.; CHO, H.Y.; YANG, H.C. Purification and characterization of bromelain isolated from pineapple. **Journal of the Korean Agricultural Chemical Society**. Coréia do Norte v.35, p.300-307, 1992.

THORNE RESEARSH. **Bromelain**. *Alternative Medicine Review*, Dover, v.3, n.4, p.302-305, 1998. Disponível em: < www.thorne.com/pdf./jornal/3-4/bromelain_monograph.pdf >. Acesso em: 13. ago. 2013.

TOCHI, B. N.; ZHANG, W.; YING, X.; WENBIN, Z. Therapeutic application of pineapple protease (bromelain): A review. **Pakistan Journal of Nutrition**. Faisalabad, v.7, n.4, p. 513-520, 2008.

VENTURA, J. A.; CABRAL, J. R. S.; MATOS, A. P.; COSTA, H. **“Vitória”**: nova cultivar de abacaxi resistente a fusariose. Vitória: DCM -INCAPER, 2006, 4 p. (2 folder).

VENTURA, J. A. ; CABRAL, J. R. S. ; MATOS, A. P. ; COSTA, H. 'Vitória': new pineapple cultivar resistant to fusariose. **Acta Horticulturae**. Honolulu, v. 822, p. 51-54, 2009

XUE, Y.; WU, C.; BRANFORD-WHITE, C.J.; NING, X., NIE, H.; ZHU, L. Chemical modification of stem bromelain with anhydride groups to enhance its stability and catalytic activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. Amsterdam, v. 63, p.188–193, 2010.

ZARE, H.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A.; SALAMI, M.; MIRZAEI, M.; SABOURY, A. A.; SHEIBANI, N. Purification and autolysis of the ficin isoforms from fig (*Ficus carica* cv. Sabz) latex. **Phytochemistry**. Londres, v. 87, p. 16-22, 2013.

YIN, L.; SUN, C.K.; HAN, X.; XU, L.; XU, Y.; QI, Y.; PENG, J. Preparative purification of bromelain (EC 3.4.22.33) from pineapple fruit by high-speed counter-current chromatography using a reverse-micelle solvent system. **Food Chemistry**. Barkin, v.129, n.3, p. 925–932, 2011.

WU, S.; HU, W.; ZHANG, B.; LIU, S.; WANG, J.; WANG, A. Bromelain ameliorates the wound microenvironment and improves the healing of firearm wound. **Journal of Surgical Research**. Nova York, v. 176, n. 2, p.503-509, 2012.

APÊNDICE

APENDICE A – Depósito de Patente: “Processo de Purificação de Bromelina, Bromelina purificada e usos da enzima purificada”

A modalidade de invenção proposta trata de um processo de purificação de enzima proteolítica, a enzima purificada e seus usos. É proposto um método para a purificação da enzima em questão, mas especificamente a bromelina, a partir de produtos orgânicos, em especial resíduos agrícolas do abacaxizeiro (*Ananas comosus*). O extrato vegetal é filtrado e centrifugado, obtendo-se um sobrenadante, que é aplicado em uma coluna de troca iônica. As frações obtidas são submetidas a colunas de exclusão, obtendo-se a protease purificada, com baixo custo e aproveitamento de resíduos. O processo proposto permite a manutenção da atividade biológica da bromelina, permitindo a esta uma vasta aplicação biotecnológica, de interesse para indústria farmacêutica, cosmética, alimentícia e de bebidas.

| | |
|---|--|
|  <p>23/10/2012 025120000612 13-02 REES 52400.070638/2012-41</p> |  <p>23/10/2012 025120000612 13-02 REES BR 10 2012 027122 2</p> |
| Espaço reservado para protocolo | |
| DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO | |
| <p>Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial: O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:</p> | |
| <p>1. Depositante (71):</p> <p>1.1 Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO - UFES</p> <p>1.2 CNPJ/CPF: 32479123/000143</p> <p>1.3 Endereço completo: AV. FERNANDO FERRARI, 514, VITÓRIA - ES</p> <p>1.4 CEP: 29075910</p> <p>1.5 Telefone: (27) 40097885 1.6 Fax: (27) 40092438</p> <p>1.7 E-mail: init@prppg.ufes.br</p> | |
| <input checked="" type="checkbox"/> continua em folha anexa | |
| <p>2. Natureza: <input checked="" type="checkbox"/> Invenção <input type="checkbox"/> Modelo de Utilidade <input type="checkbox"/> Certificado de Adição</p> | |
| <p>Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: INVENÇÃO</p> | |
| <p>3. Título da Invenção, Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição (54): PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE BROMELINA, BROMELINA PURIFICADA E USOS DA ENZIMA PURIFICADA</p> | |