

Avaliação da atividade da enzima bromelina em resíduo agroindustrial de curauá (*Ananas erectifolius* L.B.Smith).

Machado, Isaac Stringueta¹; Bertozzo, Fernanda²; Michelini, Janaína³; Cantanhêde, Ilka South de Lima⁴; Soriano, Leonardo⁵.

¹Professor Doutor da Faculdade de Ciências Agronômicas (UNESP-FCA), Departamento de Recursos Naturais, Campus Botucatu, Caixa Postal 237, CEP 18603-970, Botucatu, São Paulo, fone (14) 3811-7162, e-mail: isaac@fca.unesp.br ; ²Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (UNESP-FCA), Campus Botucatu, Caixa Postal 237, CEP 18603-970, Botucatu, São Paulo, fone (14) 3811-7162, e-mail: bertozzo@fca.unesp.br ; ³Bióloga Estagiária do Departamento de Recursos Naturais (UNESP-FCA), Departamento de Recursos Naturais, Campus Botucatu, Caixa Postal 237, CEP 18603-970, Botucatu, São Paulo, fone (14) 3811-7162, e-mail: janainamichelin@fca.unesp.br ; ⁴Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (UNESP-FCA), Campus Botucatu, Caixa Postal 237, CEP 18603-970, Botucatu, São Paulo, fone (14) 3811-7162, e-mail: ilcalc@fca.unesp.br ; ⁵Graduando do Curso de Engenharia Florestal (UNESP-FCA), Campus Botucatu, Caixa Postal 237, CEP 18603-970, Botucatu, São Paulo, fone (19) 9141-8231, e-mail: lsoriano@fca.unesp.br .

INTRODUÇÃO

O curauá (*Ananas erectifolius* L.B.Smith) é uma bromeliácea produtora de fibras com características físico-químicas ideais para a elaboração de novos materiais (compósitos), componentes bastante valorizados pela indústria automobilística e a de móveis (Zah et al., 2006). A planta contém níveis significativos da enzima bromelina, de alto valor comercial e com ampla aplicação em diversas áreas, como clarificação de cerveja, fabricação de queijos, tecnologia de alimentos, tratamento de distúrbios digestivos, feridas, inflamações e terapias contra o câncer, onde aumenta lises de células carcinogênicas (Meinig,1999). É também usada no tratamento do couro, nas indústrias têxteis para amaciamento de fibras e na produção de detergentes (Santos, 1995).

A determinação da atividade da bromelina em plantas de curauá pode resultar em indicativos para posterior purificação da enzima, além de otimizar o uso dessa planta, uma vez que o principal produto de extração é a fibra e os demais componentes considerados resíduo. No entanto, neste resíduo pode estar sendo descartada a enzima bromelina, produto cujo valor comercial é muito maior que o valor da própria fibra.

Esta pesquisa tem como objetivo determinar a atividade cinética da enzima bromelina em folhas e frutos (polpa) de plantas de curauá, cultivares “branco” e “roxo”, base para estudo posterior da extração e purificação, otimizando assim, a utilização desta espécie vegetal.

METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados nos campos experimentais e nos laboratórios de Biotecnologia de Plantas e Resíduos Sólidos/Compósitos, do Departamento de Recursos Naturais, Faculdade de Ciências Agronômicas, da UNESP, Campus de Botucatu - SP.

Matrizes de curauá (*Ananas erectifolius* L.B.Smith) dos cultivares “branco” e “roxo” foram cedidas pelo Projeto POEMA, Estado do Pará, e cultivadas nos campos experimentais da Fazenda Lageado e Fazenda São Manuel, ambas pertencentes à UNESP. As mudas com cerca de 40 a 50 cm de altura foram instaladas em espaçamento de 1 x 0,5 m e conduzidas nos moldes da tecnologia agronômica pertinentes, com preparo, correção e fertilização dos solos; cobertura morta; irrigação e controle nutricional por análise foliar.

Para determinação da atividade da bromelina foram utilizados folhas e frutos, coletados em dois estágios diferentes de desenvolvimento da planta: na fase adulta, em que os frutos ainda estavam verdes e as folhas estavam com 1m de comprimento, aproximadamente; e na fase de senescência, em que as folhas estavam amareladas e os frutos maduros. Foram realizadas três repetições de amostragem de cada parte da planta. O preparo das amostras, o ensaio de precipitação e a determinação da atividade enzimática foram baseados nos métodos descritos por Murachi (1970), Baldini et al. (1993) e César et al. (1999).

Folhas foram coletadas no campo e distribuídas em lotes, sendo cada lote constituído por três folhas de uma mesma planta. Posteriormente decortificadas em um processo semelhante ao processo utilizado pela agroindústria, para a separação das fibras. A mucilagem residuária foi triturada com água destilada em processador, resultando em uma solução com concentração de 500g de resíduo/L.

Os frutos foram igualmente distribuídos em lotes, sendo cada lote constituído de um único fruto. Foram descascados logo após a colheita e, em seguida, triturados em processador, resultando em uma solução com concentração de 500g de resíduo/L. A casca dos frutos foi desprezada.

Todos os lotes foram coados e armazenados sob congelamento a -18°C. Para a realização dos ensaios de concentração e precipitação, as alíquotas foram descongeladas e centrifugadas a 15.000g por 15 minutos sob refrigeração a 5°C; assim, ocorreu a separação das fibras do sobrenadante líquido, que foi utilizado para precipitação da enzima.

Para a realização dos ensaios de precipitação das amostras foram tomadas alíquotas de 40 ml do sobrenadante e em seguida, resfriadas em banho de gelo e sal sob agitação. Após, foi adicionado etanol frio (5°C) até o volume final de 80% v/v; nestes procedimentos tomou-se o cuidado de manter a temperatura constante, evitando assim, desnaturação do material protéico.

Após a precipitação, as amostras foram centrifugadas a 1500g por 30 minutos, sob refrigeração. Separadas as frações sobrenadantes, foram medidos os volumes e, em seguida, os precipitados foram solubilizados em diferentes volumes de tampão fosfato 30 mM, pH 6,0. Na seqüência, chegou-se à concentração de 1g/ml dos precipitados solubilizados.

A atividade proteolítica foi determinada através da hidrólise enzimática da caseína a 1,2% (p/v), pH 7.5 e temperatura de 35°C, durante 10 minutos. Seguiu-se a precipitação do substrato não hidrolisado com utilização de solução de ácido tricloroacético (TCA). No branco, a adição de solução de TCA foi feita antes da adição da enzima. A quantidade de produtos hidrolíticos não precipitados, ou seja, de peptídeos solúveis em TCA foi determinada em espectrofotômetro a 280 nm contra um branco.

Uma unidade de atividade enzimática (U) corresponde à quantidade de enzima capaz de variar em uma unidade a leitura de absorbância a 280 nm, durante 10 minutos a 35°C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta os resultados da atividade enzimática na mucilagem residuária da decortificação de folhas e em polpa do fruto do curauá, cultivares “branco” e “roxo”. Os valores referem-se a duas fases distintas de avaliação: época da colheita industrial da fibra e fase de senescência das plantas.

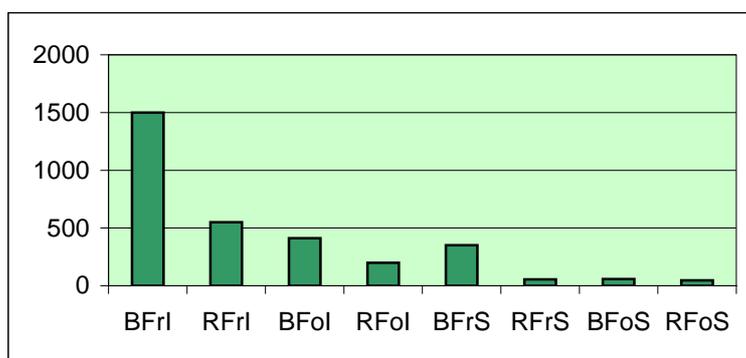


Figura 1. Atividade enzimática de curauá, cultivares “branco” e “roxo”, em duas fases distintas: colheita industrial da fibra e senescência das plantas. Legenda:

BFrl = Fruto imaturo de curauá “branco”

BFol = Folha adulta de curauá “branco”

BFrS = Fruto de curauá “branco” em senescência

BFoS = Folha de curauá “branco” em senescência

RFrL = Fruto imaturo de curauá “roxo”
 RFoL = Folha adulta de curauá “roxo”
 RFRS = Fruto de curauá “roxo” em senescência
 RFoS = Folha de curauá “roxo” em senescência.

A folha de curauá na época da colheita industrial, tanto no cultivar “branco” quanto “roxo”, apresenta teores menores de atividade enzimática em relação ao fruto, 27,4% e 36,18%, respectivamente (Tabelas 1). Estes valores se aproximam dos valores encontrados por César et al. (1999) ao trabalharem com talo, casca e fruto de abacaxi; onde também observaram a viabilidade de recuperação da enzima nestas condições e no reaproveitamento do resíduo de indústrias de conserva. O potencial de obtenção da bromelina na indústria automobilística pode ser igualmente significativo, pois as fibras representam em torno de 5-8% da planta e o restante é mucilagem residuária, atualmente descartada no meio ambiente, em volume médio de 90 toneladas por dia (Leão et al., 2000 e Zah et al., 2006).

Tabela 1. Valores médios da atividade enzimática (U/L e U/g) em folhas e frutos de curauá no estágio de colheita.

CULTIVAR	ATIVIDADE ENZIMÁTICA			
	FOLHA		FRUTO	
	(U/L)*	(U/g)**	(U/L)	(U/g)
“BRANCO”	411	0,8	1500	2,5
“ROXO”	199	0,4	550	1,1

*U/L: Unidade de atividade enzimática por litro de água residuária.

**U/g: Unidade de atividade enzimática por grama de mucilagem.

As partes da planta analisadas após o período ideal de colheita revelaram valores de atividade enzimática inferiores (Tabela 2). Da mesma forma, as folhas apresentaram menor atividade proteolítica que os frutos, 16,28% e 82,14% para os cultivares “branco” e “roxo” respectivamente. Tudo indica que a queda da atividade seja devido à senescência do tecido foliar e do fruto após a maturidade, conforme discutido acima. Desta forma, os resultados assim obtidos confirmam que a época de colheita realizada pela indústria coincide com o melhor estágio fisiológico da planta em termos de potencial enzimático.

Tabela 2. Valores médios da atividade enzimática (U/L e U/g) em folhas e frutos de curauá no estágio de senescência (após época de colheita).

CULTIVAR	ATIVIDADE ENZIMÁTICA			
	FOLHA		FRUTO	
	(U/L)*	(U/g)**	(U/L)	(U/g)
“BRANCO”	57	0,1	350	0,7
“ROXO”	46	0,092	56	0,1

*U/L= Unidade de atividade enzimática por litro de água residuária.

**U/g= Unidade de atividade enzimática por grama de mucilagem.

Embora o fruto apresente altos valores de atividade enzimática, a sua utilização industrial não seria viável devido ao manejo agrônomico das plantas, onde a primeira colheita das folhas ocorre aos doze meses de cultivo da planta, seguida de cortes sucessivos de seis em seis meses. Este esquema interrompe a indução e desenvolvimento da infrutescência (Ledo, 2002). A atividade enzimática observada no fruto mostrou grande variação durante os estágios de seu desenvolvimento; é crescente até a maturidade e declina a partir desta fase. Esta observação é concordante com aquela encontrada por Baldini et al. (1993) em abacaxi, que não verificaram atividade enzimática nos primeiros estágios de desenvolvimento do fruto; entretanto, seu nível aumentava rapidamente, mantendo-se elevado até que, por ocasião do amadurecimento, decrescia ligeiramente, havendo uma queda marcante de atividade da protease durante o período final da maturação.

CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, e nas condições experimentais empregadas, é possível concluir que tanto as folhas quanto os frutos dos cultivares “branco” e “roxo” apresentaram bromelina bioquimicamente ativa, sendo que nos frutos a atividade cinética mostrou-se significativamente maior que nas folhas. Há viabilidade de precipitação e/ou filtração da enzima para fins comerciais nos resíduos industriais de ambas estruturas analisadas (folha e fruto). Diferentemente do observado na micropropagação de mudas *in vitro* e nos processos convencionais de multiplicação e cultivo no campo, o cultivar “branco” revelou maior potencial de atividade cinética enzimática. A época da colheita pela indústria, um ano após o plantio das mudas, coincide com o estágio fisiológico ideal da planta em termos de atividade enzimática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDINI, V. L. S.; IADEROZA, M.; FERREIRA, E. A. H.; SALES, A. M.; DRAETTA, I. S.; GIACOMELLI, E. J. Ocorrência da Bromelina em cultivares de abacaxizeiro. **Colet. ITAL**, Campinas, v. 23, n. 1, p. 44-55, 1993.

CÉSAR, A .C. W.; LUCARINI, A. C.; SILVA, R. Recuperação das enzimas proteolíticas presentes na casca e talo do abacaxi. **Revista de Iniciação Científica**, São Carlos, p. 47-53, 1999.

LEÃO, A. L.; CARASCHI, J. C.; TAN, I. H. Curaua fiber – a tropical natural fibers from Amazon potential and applications in composites. In: FROLLINI, E.; LEÃO, A. L.; MATTOSO, L. H. C. **Natural Polymers and Agrofibers Composites**. São Carlos: USP & UNESP, 2000. p. 257-272.

LEDO, I. A. M. O cultivo do curauá no Lago Grande de Franca. Belém: BASA, 1967.23 p. apud. LAMEIRA, O. A.; COSTA, M .R.; YOSHINO, V. C. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Ano V, n. 26, p. 28, maio/jun. 2002.

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

MURACHI, T. Bromelain enzymes. In: PERGMANN, G. E.; LORAND, L. **Methods in enzymology**. New York: Academic Press, 1970. p. 273-84.

SANTOS, S. A. **Efeito do tempo na composição físico-química, química e na atividade da bromelina do caule do abacaxizeiro *Ananas comosus* (L.) Merr. Cv. Pérola, armazenado em condições com e sem refrigeração**. 1995. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1995.

ZAH, R.; HISCHIER, R.; LEÃO, A. L.; BRAUN, I. Curaua fibers in the automobile industry. **Journal of Cleaner Production**, n. 15, p. 1032-1040. 2007.

PALAVRAS-CHAVE

Ananas erectifolius L.B.Smith; curauá; bromelina; atividade cinética.