

# **EXTRAÇÃO E PELETIZAÇÃO DA BROMELINA PRESENTE NOS RESÍDUOS DO ABACAXI (*ANANAS COMOSUS L. MERRIL*)**

Bárbara Regina Mião Pereira <sup>1</sup>; Moacyr Jorge Elias <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Aluna de Iniciação Científica da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN – IMT);

<sup>2</sup> Professor da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN – IMT).

**Resumo.** A bromelina, enzima proteolítica presente no abacaxi (*Ananas Comosus L. Merril*), tem diversas aplicações, envolvendo a indústria de alimentos, a área medicinal e a nutrição para animais. Pode ser obtida através da Trituração e centrifugação das partes do fruto, gerando um extrato com elevada concentração da enzima. O precipitado obtido pela adição de etanol, misturado com uma carga apropriada (celulose micro cristalina) forma um composto que pode ser extrusado em “pellets”, de modo a ser administrado oralmente. Como meta propôs-se um trabalho de pesquisa visando à extração, precipitação e desenvolvimento de uma forma terapêutica de dosagem no formato de “pellets” contendo a enzima, utilizando equipamentos disponíveis na Escola de Engenharia Mauá (extrusor e esferonizador). A atividade enzimática foi estudada ao longo do tempo para verificar a estabilidade da enzima, no extrato, no precipitado e na forma de pellets com celulose, durante a estocagem. Foram utilizadas a casca e o talo interno do abacaxi como fonte de bromelina visando seu aproveitamento a partir dos resíduos da industrialização do fruto. Os resultados mostraram que a enzima no extrato e no precipitado é estável ao longo do tempo; para os pellets, resultados iniciais também mostraram estabilidade da bromelina.

## **Introdução**

Uma das condições fundamentais para a vida é a capacidade que os organismos vivos apresentam de catalisar reações químicas de forma eficiente e seletiva. Catalisadores são compostos capazes de aumentar a velocidade da reação sem alterar a proporção entre reagentes e produtos encontrada no final da reação e sem serem efetivamente consumidos durante o processo (Borzani, Schmidell e Lima, 2001). Sem a catálise, as reações químicas não poderiam ocorrer em uma escala de tempo conveniente (Lehninger, Nelson e Cox, 2007).

As enzimas estão no centro de todos os processos bioquímicos, pois possuem um grande poder catalítico, superior ao apresentado pelos catalisadores sintéticos e inorgânicos. Possuem um elevado grau de especificidade com respeito ao substrato, acelerando reações químicas e atuando em soluções aquosas em condições suaves de temperatura e pH. As enzimas tem se convertido em ferramentas importantes, não apenas na medicina como também na indústria química, alimentícia e na agricultura (Lehninger, Nelson e Cox, 2007).

A bromelina, conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nos vegetais da família *Bromeliaceae* e pertencente ao grupo de sulfidril proteases, tem aplicação em diversas áreas envolvendo industrialização de alimentos e medicina, passando pela indústria de cosméticos, na desodorização de gases e nutrição animal. Na indústria de alimentos pode ser empregada, por exemplo, na hidrólise da miosina produzindo efeito de amaciamento da carne. Na medicina demonstra-se (*in vitro*) que, devido à sua capacidade proteolítica, é capaz de reduzir o crescimento de tumores (Maurer et al., 1988; Harrach et al., 1998). A bromelina também é empregada nos casos de inflamação associada com edema causado por ferimentos traumáticos ou pós-operatórios (White et al., 1988); inflamações do trato respiratório, inflamações causadas por distúrbios circulatórios (trombo flebite), e também para aumentar a atividade de antibióticos (Lotz-Winter, 1990). Segundo Brakebusch et al. (2001), as funções biológicas da bromelina têm valor terapêutico modulando a coagulação do sangue e promovendo a absorção de drogas. Um estudo efetuado em voluntários saudáveis e pacientes com desordem no sistema imunológico mostrou que a bromelina estimula as propriedades deste sistema. Na área de nutrição animal, a enzima foi estudada como agente de degradação de proteínas presentes em

alimentos destinados a ruminantes, pois tem a característica de hidrolisar ligações peptídicas das proteínas.

Encontra-se presente no talo, na polpa e na casca do fruto abacaxi (*Ananas comosus*) cujas enzimas são referidas de forma genérica como bromelinhas. Segundo Freiman e Sabaa-Srur (1996), um dos processos, que envolve a precipitação com álcool etílico, pode ser resumido na seqüência: desintegração das partes da planta, filtração, centrifugação (10000 rpm, por 20 minutos a 5 °C) obtendo-se o extrato bruto; precipitação com álcool etílico a 10 °C (proporção 1:1), repouso (por 24 horas a 5 °C), e centrifugação (10000 rpm por 20 minutos a 5 °C), obtendo-se o precipitado final. Cesar (2005) trabalhou na recuperação de praticamente toda bromelina do abacaxi empregando a precipitação em um estagio com etanol a 5 °C.

Para fins medicinais da bromelina é necessário peletizar o precipitado obtido através do extrato do fruto, pois na indústria farmacêutica é consenso que sistemas de dosagem compostos por múltiplas unidades — *pellets* — apresentam algumas vantagens com relação àqueles de dosagem única — drágeas ou comprimidos. A passagem de um sistema múltiplo pelo aparelho digestivo ocorre com melhor distribuição e absorção do princípio ativo, resultando em um perfil de liberação/absorção mais previsível e reduzindo concentrações locais excessivas, muitas vezes responsáveis por efeitos colaterais (Salsa, Veiga e Pina, 1997; Kramer e Blume, 1994; Yuen, Deshmukh e Newton, 1993). Esses *pellets* podem ser acondicionados em cápsulas gelatinosas ou até mesmo comprimidos. A primeira opção é a mais usual, pois facilita o desenvolvimento do produto, uma vez que não existe a preocupação com a resistência do granulo à compressão.

Considerando as estimativas da quantidade de bromelina presente no fruto, 1 a 2 gramas por kg (Tisseau, 1986), e no precipitado, chegou-se ao resultado de que para uma dose diária média de 100 mg de bromelina (em torno de oito cápsulas por dia), agindo como suplemento vitamínico, seriam precisos 4,30 gramas de precipitado. Outras funções da bromelina dependem de uma maior dosagem. Sabe-se que em 1972 foi reportado o uso de bromelina em pacientes com câncer: a administração diária de 600 mg de bromelina em mulheres portadoras de câncer de mama e ovário demonstrou redução de metástases nas pacientes (Gerard, 1972).

Os excipientes empregados na formulação de *pellets* são tipicamente aqueles utilizados na fabricação de comprimidos. Os excipientes são responsáveis por conferir a forma, a friabilidade, a dureza e as características de dissolução desejadas, com o objetivo final de fazer com que as drogas sejam liberadas e absorvidas no organismo da maneira necessária (Harris, 1989). Os principais tipos de excipientes empregados na fabricação de *pellets* são os diluentes — como a celulose micro cristalina (MCC), os ligantes — como polivinilpirrolidona (PVP) e hidroxipropilmetylcelulose (HPMC), e ainda os desintegrantes, lubrificantes, tensoativos e antiaderentes.

A ação hidrolítica da enzima bromelina presente no extrato, precipitado e *pellets*, segue o modelo de Michaelis - Menten, que considera a reação reversível entre a enzima e o substrato formando um complexo intermediário, com parte deste complexo gerando produtos e restituindo a enzima (Elias, 2010).

Neste trabalho foi enfocada a bromelina presente na casca e no talo do abacaxi, visando seu aproveitamento a partir dos resíduos da industrialização do fruto.

## Material e Métodos

Os ensaios foram efetuados nos Laboratórios de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Escola de Engenharia Mauá do Instituto Mauá de Tecnologia. O abacaxi variedade pérola, do qual se aproveitou a casca e o talo do fruto, foi adquirido diretamente do mercado. Como substrato, foi utilizado caseína (Labsynth). Todos os reagentes utilizados foram grau analítico.

Para a execução dos ensaios, as dispersões (substrato, extrato do fruto e pellets) foram tamponadas (68g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 87g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> diluídos para 1 L) e o pH ajustado entre 6,0 e 6,5, valor ótimo para a atividade enzimática conforme a literatura (Elias, 2010). A reação de hidrólise da caseína para determinação da atividade foi conduzida a 35 °C, condição na qual não se observa desativação térmica (Elias, 2010).

O procedimento para obter o extrato da casca e do talo obedeceu a seguinte seqüência: retirada da coroa; lavagem dos frutos com água corrente; separação da casca e do talo; corte em pedaços pequenos; triturar e separar o bagaço (Juicer Walita RI1861); recolher o extrato em recipiente contendo tampão (proporção 1 mL de solução tampão para cada 20 mL de dispersão do extrato; para valores fracionados arredondou-se o volume da solução tampão para o valor imediatamente acima, de modo a permitir a sua dosagem com pipeta); ajustar o pH para o valor desejado empregando NaOH 1 M ou HCl 0,5 M, acondicionar em garrafas e estocar no *freezer* em temperaturas abaixo de 20 °C negativos.

O extrato foi precipitado conforme técnica já estudada (Cesar, 2005). Para cada 100 mL de extrato foram utilizados 400 mL de álcool etílico 95%. O procedimento foi: reduzir a temperatura do extrato e do álcool para 5 °C; em bêquer de 4 L adicionar o extrato; adicionar o álcool lentamente sob agitação; manter a agitação por 35 minutos observando a temperatura em 5 °C; centrifugar por 20 minutos (5000 rpm); retirar o precipitado e deixá-lo exposto ao ambiente (20 horas) permitindo a evaporação do álcool residual; armazenar em vidraria fechada (7 °C).

A massa para produção dos pellets foi preparada misturando o precipitado com água e MCC. Após ensaios exploratórios, a proporção que se mostrou mais adequada foi: 23% precipitado / 38% MCC / 39% água. Os pellets foram produzidos pelo processo de extrusão-esferonização (Santos et. al., 2004; Chatchawalsaisin et al., 2005). A preparação foi: mistura dos ingredientes (Batedeira Arno Ciranda Chrome Automatic); extrusão da massa (rotação 50 rpm); esferolização (900 rpm) coletando os pellets após 16 segundos; secagem (estufa por 24 horas a 50 °C); determinar a granulometria (encontrada na faixa de 0,6 mm a 1,2 mm de diâmetro). Os pellets foram armazenados sob temperatura ambiente em local fresco e longe do sol, assim estudou-se o comportamento de sua atividade enzimática no decorrer dos dias, relacionando as encontradas com a inicial.

A quantidade de dispersão de caseína, na concentração de 20 g.L<sup>-1</sup>, foi preparada conforme a necessidade, no máximo na véspera do ensaio, e mantida sob refrigeração (7 °C). A rotina do preparo foi: adicionar (temperatura ambiente) aproximadamente 80 % da água total; iniciar aquecimento e agitação; manter o pH entre 6,5 e 7,0 (adição de NaOH 1 M); agitar até completa dispersão (aquecimento até 80 a 85 °C); resfriar até temperatura ambiente; adicionar tampão tomando como base a proporção 1 mL de solução tampão para cada 20 mL de dispersão de caseína; ajustar o pH para o valor desejado empregando NaOH 1 M ou HCl 0,5 M; passar para um balão volumétrico e avolumar até a marca de aferição.

Foram preparadas, separadamente, dispersões de 4 g de extrato, 0,5 g de precipitado e 4 g de pellets, avolumando até 50 mL. Metade do volume foi destinada à determinação do branco e metade à determinação da atividade enzimática. A rotina da preparação foi: adicionar o extrato (ou precipitado, ou pellets) em bêquer; adicionar água e homogeneizar; transferir para um balão de 50 mL, avolumar com água.

A hidrólise do substrato foi efetuada em bêquer (100 mL) com agitador de vidro e rotação variável. A rotação escolhida foi a máxima possível de modo a não permitir incorporação de ar ao meio reacional, o que causaria erro na quantidade pipetada para análise dos aminoácidos formados. A rotina de preparação foi: pipetar 50 mL da dispersão de caseína e adicionar ao bêquer; instalar o bêquer no banho termostático e iniciar a agitação; pipetar 25 mL da dispersão do extrato (ou do precipitado, ou dos pellets) e adicionar ao bêquer, o tempo zero foi considerado após a adição de toda a enzima; após o tempo de reação pré-determinado (10 minutos) foi pipetada uma amostra do meio reacional (5 mL) e adicionada a um tubo de centrífuga, já com 5 mL de uma solução de TCA 0,3 M (precipita a enzima e a proteína não

reagida, extinguindo a reação de hidrólise); o tempo de reação considerado foi desde o zero até metade da adição da amostra na solução de TCA; os tubos com as amostras foram centrifugados por 20 minutos a 5000 rpm, empregando centrífuga marca Fanem; o sobrenadante foi transferido para uma cubeta de quartzo e lida a absorbância.

Quando a caseína é submetida à ação da bromelina ela sofre hidrólise liberando aminoácidos, dentre eles os aromáticos (tirosina, triptofano e fenilalanina) que são detectáveis por absorbância a 280 nm de comprimento de onda. A leitura da absorbância foi feita no espectrofotômetro Varian modelo Cary 1E. As amostras foram colocadas em cubetas de quartzo, recomendadas para emprego no comprimento de onda utilizado, com espaçamento interno de 10 mm. As cubetas, uma com a amostra e outra com água, foram instaladas nas câmaras apropriadas.

Os valores de absorbância das amostras foram lidos para determinar a quantidade de aminoácidos aromáticos presentes, descontando-se a absorbância lida para o branco. A quantidade de aminoácidos aromáticos foi expressa em quantidade de tirosina. Com a curva de calibração da absorbância em função da tirosina calculou-se a correspondência em mmol de tirosina por litro.

A correlação entre absorbância e os aminoácidos aromáticos foi feita empregando tirosina em diversas concentrações, assim, leu-se a absorbância e expressou-se a leitura em milimol de tirosina por litro, que corresponde aos produtos formados pela hidrólise. A curva de calibração forneceu uma relação linear (coeficiente de correlação 0,9972) da absorbância com a concentração de tirosina: A equação (1) mostra esta relação.

$$C_{tubo} = \frac{\alpha - 0,0544}{1,0398} \quad (\text{mmol de tirosina. L}^{-1}) \quad (1)$$

onde  $\alpha$  representa o valor lido da absorbância e  $C_{tubo}$  a concentração, em  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  de tirosina obtida através da absorbância.

Para obter a concentração do meio reacional, foi necessário considerar a diluição devido à adição sobre TCA 0,3 M. Como as soluções foram bem diluídas, a seguinte equação foi aplicada:

$$V_{meio\ reacional} \cdot C_{meio\ reacional} = V_{tubo} \cdot C_{tubo} \quad (2)$$

em que  $V_{meio\ reacional}$  é o volume da amostra pipetada do reator e  $V_{tubo}$  é o volume total (amostra do reator mais TCA 0,3 M) no tubo da centrifuga (ambos em mL);  $C_{meio\ reacional}$  é a concentração de aminoácidos no meio reacional e  $C_{tubo}$  é a concentração de aminoácidos no tubo da centrifuga, encontrada através da equação (1), ambos expressos em  $\text{mmol de tirosina. L}^{-1}$ .

A atividade  $A$  foi expressa em  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  de tirosina após 10 minutos de reação, conforme a equação (3):

$$A = \frac{C_{meio\ reacional}}{10\ min} \quad (\text{mmol de tirosina. L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}) \quad (3)$$

Tomando como base o trabalho desenvolvido por Elias (2010), a massa de extrato a ser pesada ficou definida em 4,00 gramas, quantidade que resultou em leituras de absorbância em torno de 1, valor de leitura recomendado por estar no centro da curva de calibração. Ainda conforme Elias (2010), as condições de melhor atividade são encontradas a 35 °C e pH entre 6,0 e 6,5; valores adotados no presente trabalho. Para determinação da atividade do precipitado e dos pellets, as quantidades foram determinadas de modo a proporcionar o mesmo valor de atividade observada para o extrato no início do trabalho; uma vez determinada a quantidade ela foi mantida fixa para os demais ensaios ao longo do tempo. Como o foco do estudo foi verificar a estabilidade da enzima em diversas condições (extrato,

precipitado e pellet), as curvas foram elaboradas dividindo-se a atividade após determinado tempo pela atividade inicial.

## Resultados e Discussão

A massa utilizada para o extrato foi de 4,00 gramas. Para o precipitado foram empregadas 0,50 gramas e para os pellets foram utilizadas 4,00 gramas. Os resultados para a  $atividade \cdot (atividade\ initial)^{-1}$  em função do tempo, encontram-se na Figura 1. Na elaboração dos gráficos para o precipitado e o extrato, valores de atividade muito discrepantes com relação à tendência mostrada, foram descartados.

Observa-se que a enzima presente no extrato (conservado a 24 °C negativos e pH entre 6,0 e 6,5) não apresentou perda de atividade ao longo de 80 dias. Quanto ao precipitado, devido ao lento processo para sua preparação, os ensaios para determinar a atividade começaram a ser efetuados após 2 meses da obtenção do extrato; os três ensaios realizados (Figura 1) mostram que a enzima no precipitado mantém a atividade, a exemplo do extrato.

Para preparação dos pellets houve necessidade de acumular 300 g de precipitado, quantidade mínima para mistura com MCC, extrusão e esferolização. Como foi obtido cerca de 10 gramas de precipitado por preparação foram necessárias 30 operações, consumindo 2 meses de trabalho. Portanto, obteve-se para o pellet apenas um resultado após o valor inicial. A Figura 1 mostra que a atividade da bromelina no pellet mais que dobrou com relação à inicial, levando-se a questionar dois pontos: homogeneidade da mistura (precipitado + MCC) e / ou a análise por absorbância.

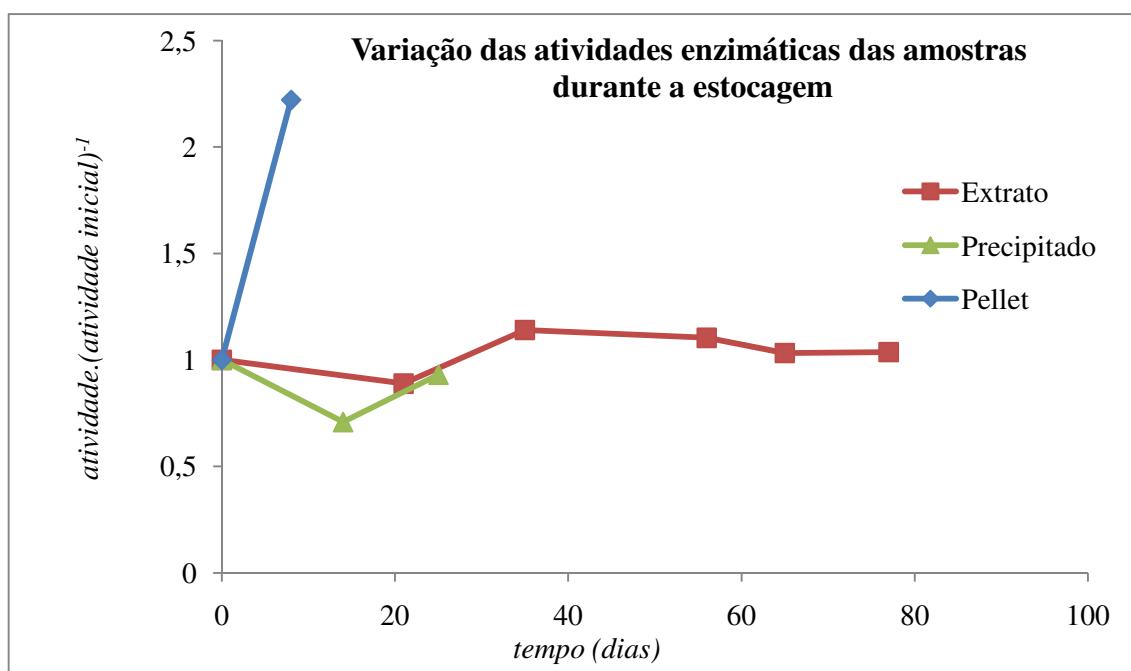


Figura 1 – Comportamento das atividades enzimáticas em relação à sua atividade inicial, ao longo do tempo.

## Conclusões

Os resultados encontrados neste trabalho mostram que a bromelina presente nos resíduos (casca e talo) do *ananas comosus* L. Merril (variedade pérola), na forma de extrato e de precipitado, apresenta um comportamento estável em relação a sua atividade enzimática. Apesar de algumas variações nos resultados ao longo do tempo as atividades encontraram-se próximas às iniciais.

Com relação aos pellets, resultados adicionais deverão ser obtidos de modo a verificar a estabilidade da bromelina misturada com o veículo para sua administração oral.

Apesar de serem poucos os resultados obtidos para o precipitado e para os pellets, pode-se esperar que os resíduos do processamento industrial do abacaxi sejam uma fonte de bromelina para a elaboração de pellets visando sua aplicação medicinal.

## Referências Bibliográficas

- Brakebusch, M. et al. Bromelain is an accelerator of phagocytosis, respiratory burst and killing of *Candida albicans* by human granulocytes and monocytes. *European Journal of Medical Research.* v. 6(5), p.193-200, 2001./ Resumo 136:149545 no Chemical Abstracts/
- Borzani, W.; Schmidell, W.; Lima, U. A.; Aquarone, E. *Biotecnologia industrial*, v. 1. São Paulo – SP, editora Edgar Blücher LTDA, p. 154–170, 2001.
- Cesar, A.C.W. *Análise de viabilidade econômica de um processo de extração e purificação da bromelina do abacaxi*. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2005, p. 60-63. Tese (Doutorado).
- Chatchawalsaisin, J. et al. The preparation by extrusion/spheronization and the properties of pellets containing drugs, microcrystalline cellulose and glycetyl monostearate. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 24 (1), p. 35-48, 2005.
- Elias, M. J. *Determinação das Condições de Atividade Ótima, da Estabilidade Térmica e da Cinética da Hidrólise Enzimática de Bromelina Presente na Casca e no Talo do Abacaxi (Ananas comosus L. Merril) Variedade Pérola*. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2010, p.36-69. Tese (Doutorado)
- Freiman, L. O.; Sabaa Srur, A.U.O. Use of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merril) agroindustrial residues for the production of bromelain. *Ciênc. Tecnol.Aliment.*, v.16(3), p. 246-249, 1996.
- Gerard, G. Anti-cancer therapy with bromelain. *Agress*; 3, p. 261-274, 1972.
- Harrach, T. et al. Isolation and characterization of two forms of an acidic bromelain stem proteinase. *J. Protein Chem.* v. 17(4), p. 351-361, 1998.
- Harris, M. R.; Pharmaceutical Pelletization Technology, *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, volume 37, 274p., Marcel Dekker, USA, 1989.
- Kramer, J.; Blume, H. Biopharmaceutical Aspects of Multiparticulates. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, volume 65: Multiparticulate Oral Drug Delivery, 490p., Marcel Dekker, USA, 1994.
- Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 4ed. São Paulo-SP, Sarvier Editora de Livros Médicos LTDA, 2007.
- Lotz-Winter, H., On the pharmacology of bromelain: an update with special regard to animal studies on dose-dependent effects. *Planta Med.*, v. 56(3), p. 249-53,1990.
- Maurer, H.R. et al; Bromelain induces the differentiation of leukemic cells in vitro: an explanation for its cytostatic effects? *Planta Med.*, v. 54(5), p. 377-81, 1988.
- Salsa, T.; Veiga, F.; Pina, M. E. Oral controlled-release dosage forms I. Cellulose ether polymers in hydrophilic matrices. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 23(9), pp.929-938, 1997.
- Santos, H. M. M.; Veiga, F. J. P.; Pina, M. E. T; Sousa, J. J. M. Obtenção de Pellets por Extrusão e Esferonização - Parte I – Avaliação das variáveis tecnológicas e de formulação. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.40, nr.4, 2004.
- Tisseau, R. Use of pineapple canning waste. Feasibility of bromelain extraction. *Fruits*, v. 41(12), p. 703-8, 1986./ Resumo 106:219081 no Chemical Abstracts/
- White, R.R. et al; Bioavailability of <sup>125</sup>I-bromelain after oral administration to rats. *Biopharm. Drug Dispos.*, v. 9(4), p. 397-403, 1988./ Resumo 109:85710 no Chemical Abstracts/
- Yuen, K. H; Deshmukh, A. A.; Newton, J. M. Development and In-Vitro Evaluation of a Multiparticulate Sustained Release Theophylline Formulation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 19(8), pp.855-874, 1993.