

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos**  
**Área de Bromatologia**

**EFEITO DA TEMPERATURA E DE ATIVADORES  
NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DA BROMELINA**

**LAURO DOMINGOS MORETTO**

**Tese para obtenção do grau de  
DOUTOR**

**Orientador:**

**Prof. Titular RENATO BARUFFALDI**

**São Paulo**

**1992**

*À minha esposa Marilena  
pelo incentivo e compreensão  
e aos meus filhos Reinaldo e  
Regina pelo futuro que representam*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Renato Baruffaldi pela orientação, incentivo e empenho.

Ao Sr. Antonio Gerson de Araújo e Jair Bianconcini pela ajuda na coleta das amostras.

Ao Sr. Paulo Okamura, administrador da Fazenda Suzuki, pela gentil cessão do material para as provas.

Ao Sr. Laudelino Torres pela ajuda no processo de moagem e prensagem do material das provas.

Aos farmacêuticos Remaldo Sinemann, Paulo Miguel Bueno Araújo e à farmacêutica Elizabeth Maria de Oliveira, pela colaboração na preparação das amostras.

À engenheira química Viktoria K. Tutundjian, às farmacêuticas Laura Maria Spinosa Ramos, Nilce Kinue Mashiba Tomokane e Luciana Carla Silveira, e ao farmacêutico Silvio Luiz Gonçalves Pereira pela ajuda na realização das análises.

À Prof. Dra. Maricê Nogueira de Oliveira Stabile pela colaboração na confecção dos gráficos via microcomputador.

Ao Prof. Dr. Ary Domingos do Amaral pelo estímulo e colaboração nas análises eletroforéticas.

Aos colegas professores do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da U.S.P. pelo incentivo, com menção ao Prof. Dr. Reynaldo Nacco.


À Maria do Rosário, Angela e Juarez, funcionários do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da U.S.P., pelo permanente apoio.

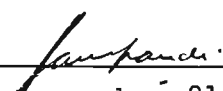
À Regina, minha filha, pela dedicada ajuda no levantamento da bibliografia.


LAURO DOMINGOS MORETTO

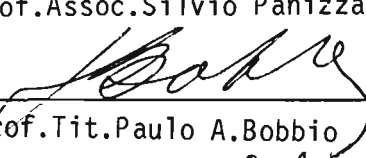
EFEITO DA TEMPERATURA E DE ATIVADORES  
NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DA BROMELINA

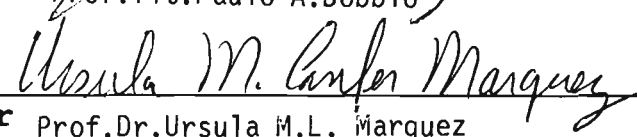
COMISSÃO JULGADORA  
TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE  
DOUTOR

  
\_\_\_\_\_  
Presidente e Orientador Prof. Tit. Renato Baruffaldi

  
\_\_\_\_\_  
2º Examinador Prof. Assoc. José Glauco Grandi

  
\_\_\_\_\_  
3º Examinador Prof. Assoc. Silvio Panizza

  
\_\_\_\_\_  
4º Examinador Prof. Tit. Paulo A. Bobbio

  
\_\_\_\_\_  
5º Examinador Prof. Dr. Ursula M. L. Marquez

São Paulo, 23 de ABRIL de 1992.

## ÍNDICE

	pág.
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1. Histórico .....	3
2.2. Nomenclatura .....	4
2.3. Composição .....	4
2.3.1. Pesos moleculares das enzimas proteolíticas do caule .....	5
2.4. Isolamento, purificação e balanço material .....	8
2.5. Estabilização, inibição e ativação .....	10
3. USOS .....	14
3.1. Usos clínicos e para-médicos .....	14
3.2. Usos na tecnologia de alimentos .....	15
4. PROPOSIÇÃO .....	16
5. MATERIAIS, MÉTODOS E PARTE EXPERIMENTAL .....	18
5.1. Limpeza .....	18
5.2. Moagem .....	18
5.3. Prensagem .....	19
5.4. Tratamento térmico, filtração e ativação .....	19
5.4.1. Preparação de amostras para estudo do efeito de ativadores .....	19
5.4.2. Preparação de amostras para estudo do efeito da temperatura de filtração, dos ativadores e dos agentes precipitantes, no balanço material e na estabilidade do extrato e da bromelina .....	21

5.4.2.1.	Provas da série A com aquecimento do extrato a 20°C .....	21
5.4.2.2.	Provas da série B com aquecimento do extrato a 30°C .....	23
5.4.2.3.	Provas da série C com aquecimento do extrato a 40°C .....	26
5.4.2.4.	Provas da série D com aquecimento do extrato a 50°C .....	28
5.4.2.5.	Provas da série E com aquecimento do extrato a 60°C .....	30
5.5.	Esquema geral das provas .....	33
5.6.	Determinação da atividade proteolítica .....	34
5.6.1.	Princípio do método .....	34
5.6.2.	Solução tampão pH 7,6 .....	34
5.6.3.	Substrato sólido para as placas .....	35
5.6.4.	Preparação das placas .....	35
5.6.5.	Preparação do padrão .....	35
5.6.6.	Preparação da amostra .....	36
5.6.6.1.	Extrato .....	36
5.6.6.2.	Bromelina (amostra) .....	36
5.6.7.	Realização do ensaio .....	37
5.6.8.	Cálculo .....	37
5.7.	Identificação .....	38
5.7.1.	Preparação das amostras e do padrão ....	38
5.7.2.	Preparação do gel de poliacrilamida ....	38
5.7.3.	Separação eletroforética .....	38
5.7.4.	Coloração e descoloração .....	39
6.	<b>RESULTADOS</b> .....	40
6.1.	Ativação e estabilização da atividade proteolítica .....	41

6.2. Efeito do tratamento térmico e de ativadores sobre a purificação por filtração do extrato, na ativação e na estabilização da atividade proteolítica .....	46
6.3. Efeito do tratamento térmico no extrato e de ativadores sobre o rendimento de bromelina e no balanço material .....	55
6.4. Efeito do tratamento térmico e de ativadores sobre a estabilidade da bromelina precipitada por acetona e por sulfato de amônio .....	62
7. CONCLUSÕES .....	77
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	80



## RESUMO

Foram realizados estudos do processo de extração de bromelina de caules de abacaxizeiro Ananas comosus (L.) Merr. cultivar Cayenne, com a finalidade de avaliar o efeito da temperatura de filtração do extrato, da adição de ativadores e de agentes precipitantes sobre a estabilidade da atividade proteolítica e no balanço material.

A filtração de extratos a 20, 30, 40, 50 e 60°C, promoveu gradual elevação da atividade proteolítica para as temperaturas até 50°C e redução a 60°C. A atividade proteolítica foi determinada em Unidades Kunitz.

A adição de agentes reconhecidamente ativadores de enzimas proteolíticas como benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e edetato dissódico aos extratos filtrados em diferentes temperaturas, promoveu elevação da atividade enzimática, demonstrando um efeito somatório com a temperatura. O extrato filtrado a 50°C, contendo ativadores, manteve-se estável durante 60 dias, quando armazenado a 5 e 20°C.

O balanço material mostrou-se superavitário quando se precipitou bromelina por sulfato de amônio, de extrato filtrado a 40°C, contendo benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e edetato dissódico. A acetona

demonstrou menor eficiência que o sulfato de amônio, em relação ao balanço material.

O estudo de estabilidade nas temperaturas de 5, 20, 30 e 40°C, durante 90 dias, das amostras de bromelina obtidas através do inter-relacionamento dos fatores temperatura, ativadores e precipitantes, revelou resultados mais favoráveis na amostra preparada a partir de extrato filtrado a 40°C, contendo benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e edetato dissódico, e precipitado por sulfato de amônio.

A performance conseguida na ativação e estabilização do extrato e no balanço material não foi ratificada em relação à estabilidade da bromelina em pó.

A bromelina em pó, seguramente, necessita de estabilizadores para consolidar as vantagens comprovadas no balanço material, na ativação e estabilização do extrato.

## SUMMARY

Studies were made on the extraction process of bromelain obtained from the stem of pineapple plant Ananas comosus (L.) Merr. variety Cayenne, with the purpose to evaluate the effect of temperature of the filtration extract, addition of activators and of precipitants agents upon the stability of the proteolytic activity and upon the material balance.

The filtration of the extracts at 20, 30, 40, 50 and 60°C results in a gradual increase in the proteolytic activity of the extract till 50°C and a reduction at 60°C. The proteolytic activity was determined in Kunitz units.

The addition of commons agents, proteolytic activators like sodium benzoate, cysteine hydrochloride and sodium edetate to the filtrated extracts of stem pineapple at different temperatures promote one elevation of the activity showing an additive effect with the temperature.

The filtrated extract at 50°C and with activators was stable for 60 days when stored at 5 and 20°C.

The material balance showed a superavit when the precipitation of bromelain was made by ammonium sulphate in relation to others filtrated at 40°C, obtained with sodium benzoate, cysteine hydrochloride and sodium edetate.

The acetone showed less efficiency than the ammonium sulphate in relation to the material balance.

The stability study of the bromelain at the temperature of 5, 20, 30 and 40°C during a period of 90 days and obtained through the interrelationship of factors like temperature, activators and precipitants showed best results to bromelain sample prepared from the filtrated extract at 40°C with sodium benzoate, cysteine hydrochloride and sodium edetate and precipitated with ammonium sulphate.

The performance related to the activation, stabilization and in the material balance was not confirmed in relation to the stability of the bromelain powder.

The bromelain powder, certainly needs stabilizers to consolidate the advantages showed in the material balance in the activation and stabilization of pineapple extract.

## 1. INTRODUÇÃO

O estudo de enzimas constitui um campo inesgotável de pesquisas. Desde 1833, quando PAYEN e PERSOZ isolaram uma substância termo-lábil do extrato de malte que convertia o amido em açúcar, até nossos dias, a enzimologia tem recebido significantes contribuições de investigadores.

De um modo geral os primeiros trabalhos visavam principalmente o isolamento e a purificação de enzimas já conhecidas, bem como a identificação de novas fontes.

Nas últimas décadas algumas técnicas foram estabelecidas e outras aprimoradas, as quais possibilitaram conhecer aspectos fundamentais da enzimologia. Esses resultados permitiram atingir um nível elevado do conhecimento global das enzimas, muito embora ainda estejamos relativamente distantes de algumas metas importantes, tais como o completo conhecimento da biosíntese e a síntese laboratorial desses compostos. Quando se resolverem estes fenômenos, o ser humano certamente entenderá um dos mais fascinantes processos da vida.

As enzimas proteolíticas vegetais, embora recebendo menor atenção que as outras proteases, são igualmente importantes em sua ocorrência, estrutura e modo de ação.

As proteases vegetais parecem ter semelhanças funcionais com as de origem animal e microbiana, mesmo diferindo na estrutura e nos grupos específicos que estão envolvidos em sua atividade catalítica. Desta maneira, a investigação de enzimas proteolíticas vegetais aumenta não somente o conhecimento nesta área como também supre de informações válidas, por analogia, às outras proteases.

É crescente a aplicação das enzimas proteolíticas de origem vegetal, animal e microbiana, em vários campos da atividade humana, muito particularmente no processamento de alimentos. Considerando-se que essas substâncias são obtidas por via extrativa, tornam-se cada vez mais importantes as pesquisas que tenham por finalidade trazer contribuições à tecnologia de enzimas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Histórico

A descoberta da bromelina é atribuída a PECKOLT & PECKOLT<sup>83</sup> que publicaram os resultados de suas pesquisas realizadas no Brasil, em 1888.

Todavia, consta na literatura que MARCANO<sup>68</sup>, em 1891, foi o primeiro pesquisador a descrever a atividade proteolítica no suco de ananás. As substâncias ativas do suco foram separadas por precipitação com sulfato de amônio, por CHITTENDEN, JOSLIN e MAERA<sup>27</sup> em 1891.

Sob o aspecto tecnológico, atribui-se a HEINICKE, & GORTNER<sup>43</sup> o primeiro trabalho científico publicado onde se procurou demonstrar a viabilidade de obtenção e heterogeneidade da bromelina extraída de caules de abacaxizeiro.

HEINICKE<sup>44</sup> utilizou pela primeira vez o termo BROMELAIN para designar a protease de qualquer das espécie da família Bromeliaceae. Este autor também identificou a enzima em função da parte da planta de onde era obtida, resultando a terminologia bromelina do caule e bromelina da fruta.

## 2.2. Nomenclatura

A bromelina foi catalogada, em 1964, pela Comissão de Nomenclatura da IUB - International Union of Biochemistry com o nome de bromelain sob o número EC 3.4.4.24.

Em 1984 a IUB estabeleceu novos critérios, reclassificando-a para EC 3.4.22.4. Nesta classificação, 3 corresponde à classe hidrolase, 4 à sub-classe hidrolases peptídicas, 22 à sub-sub-classe cisteína-proteinases e 4 ao número sequencial de enzimas conhecidas, pertencentes às classe, sub e sub-sub-classes.

De acordo com a IUB, a bromelina corresponde às frações enzimáticas predominantes A e B do caule com II e III do fruto, sendo que II e A, e III e B se correspondem em estrutura e modo de ação<sup>34</sup>.

A utilização do nome coletivo bromelain tende a ser adotado exclusivamente para as frações A, B, II e III, retrocitadas, sugerindo-se a denominação de ananaina e comosaina para outras frações enzimáticas existentes no caule<sup>90</sup>.

## 2.3. Composição

O primeiro relato sobre a heterogeneidade da protease encontrada no caule de abacaxizeiro foi feito por



HEINICKE & GORTNER<sup>43</sup>, que através da técnica eletroforética identificaram 5 frações protéicas com atividade enzimática, as quais foram posteriormente separadas por EL GARBAWI & WHITAKER<sup>31</sup>.

### 2.3.1. Pesos moleculares das enzimas proteolíticas do caule

FEINSTEIN & WHITAKER<sup>35</sup> analisaram os 5 componentes da composição enzimática isolada do caule de abacaxizeiro. De acordo com os autores, os pesos moleculares das frações I, II, III, IV e V foram respectivamente 18.997, 19.650, 17.885, 18.020 e 20.011. O conteúdo em carboidratos das frações I a V da bromelina foi 4,62, 2,19, 2,25 e 2,46 moles de carboidrato/moles de enzima, respectivamente. A composição das frações foi: I = 16,8%, II = 27,6%, III = 30,4%, IV = 15,2% e V = 10,0%.

TAKAHASHI et al.<sup>105</sup>, tomando por base estudos prévios realizados por SILVERTEIN & KEZDY<sup>97</sup> e SCOCCA & LEE<sup>93</sup>, conseguiram identificar uma sexta fração na bromelina de caule de abacaxizeiro, a qual inclusive contém dois componentes estreitamente relacionados, mas não inteiramente idênticos.

OTA et al.<sup>79,81</sup>, realizaram um detalhado estudo no sentido de identificar as frações enzimáticas das bromelinas do caule e da fruta. Foram caracterizadas 6

frações enzimáticas na bromelina do caule que foram denominadas I-1, I-2, II-1, II-2, III e IV, e 3 frações na bromelina da fruta que receberam as identificações de A, B e C. As frações I-1 e II-1 são praticamente idênticas às frações B e A respectivamente. A fração B mostrou-se similar à I-1, com exceção do resíduo amino-terminal principal que é valina para a I-1 enquanto que a fração B contém alanina. De acordo com os autores, os pesos moleculares das frações I-1, I-2, II-1 e II-2 foram respectivamente 28.000, 18.000, 18.000 e 18.000, enquanto que para as frações A, B e C encontraram 18.000, 28.000 e 19.000.

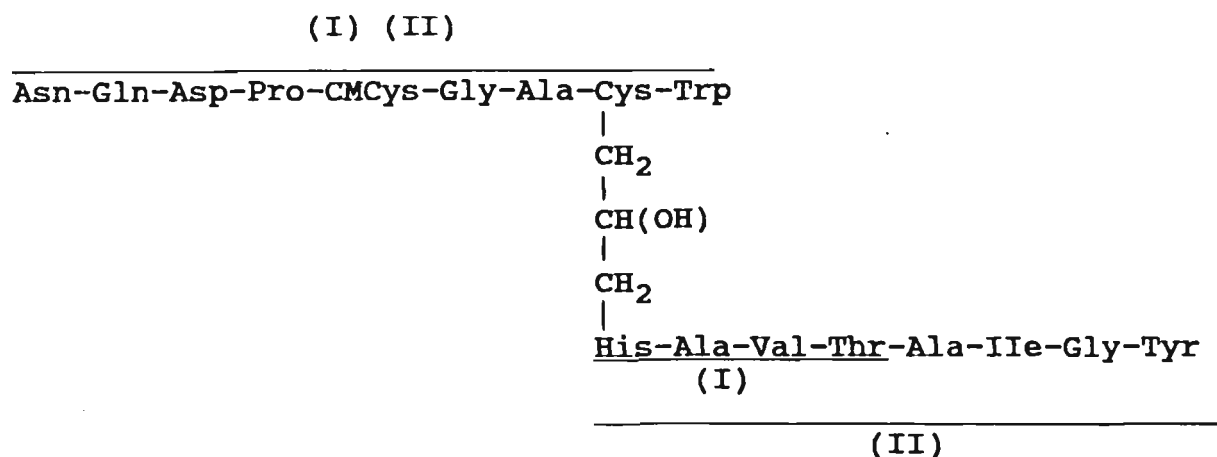
YASUDA et al.<sup>120</sup> identificaram os resíduos de carboidratos presentes na bromelina, tendo encontrado fucose, manose xilose e N-acetilglucosamina.

ISHIHARA et al.<sup>58</sup> estabeleceram a estrutura completa dos oligosacarídeos que constituem os resíduos de carboidratos que estão presentes na bromelina do caule, complementando os estudos de YASUDA<sup>120</sup>.

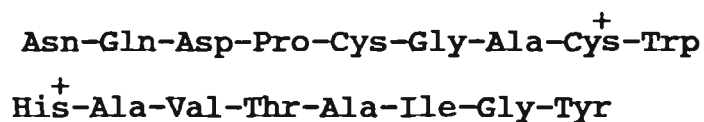
OTA et al.<sup>80</sup> separaram as frações enzimáticas da bromelina bruta de caules de abacaxizeiro, tendo encontrado atividade enzimática de 45% na fração I, 15% na fração II, 20% na fração III-1, 8% na fração III-2 e 12% na fração IV.

HUSAIN & LOWE<sup>54</sup> elucidaram a sequência de aminoácidos do centro ativo da bromelina do caule. A

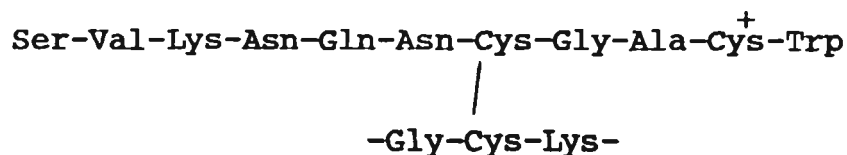
degradação Edman sequencial dos peptídeos I e II apresentou a seguinte estrutura para ambos os peptídeos :



A composição de aminoácidos em torno do sítio ativo (resíduos de cisteína e histidina) da bromelina do caule foi



Esses resultados estão em completo acordo com a sequência de aminoácidos em torno do resíduo ativo cisteinil relatado por CHAO & LIENER<sup>25</sup>. A fração I da bromelina do caule apresentou, em torno do sítio ativo cisteína, a seguinte composição de aminoácidos:



STAMBUK<sup>100</sup> realizou análises de bromelinas brutas extraídas do caule e da fruta de abacaxizeiro para determinar o teor de ferro, potássio, magnésio e cálcio. Os resultados percentuais encontrados para a bromelina de caule e da fruta foram: Fe 0,38 e 1,72; K 13,04 e 9,42; Mg 1,75 e 1,43 e Ca 7,54 e 7,70, respectivamente.

#### 2.4. Isolamento, purificação e balanço material

Os processos clássicos de isolamento de bromelina bruta estão baseados na insolubilização da enzima com sulfato de amônio até 0,6 de saturação ou por adição de acetona à solução enzimática até se obter uma concentração em volume, de 30 - 80% do solvente orgânico.

SOUZA<sup>98</sup> obteve bromelina de frutas de abacaxizeiro por precipitação com sulfato de amônio a 60% de saturação, a qual foi purificada por tratamento com solução a 1% de cianeto de potássio e reprecipitada com sulfato de amônio.

O primeiro estudo realizado no sentido de se promover o aproveitamento do abacaxizeiro para obtenção de bromelina foi feito por HEINICKE & GORTNER<sup>43</sup>, os quais obtiveram substâncias denominadas "brutas". Estes pesquisadores prensaram caules e frutos, precipitando os extratos por acetona e sulfato de amônio.

HEINICKE<sup>45</sup> também descreveu o processo de isolamento de bromelina de caules de abacaxizeiro através da prensagem dos caules e resfriamento do extrato a 1,6 - 7,2°C, adição de agentes redutores, ajuste do valor de pH para 3,5 - 5,5 e precipitação por acetona. O rendimento obtido foi 0,96%, de bromelina em pó com atividade de 4.000 unidades de coagulação de leite por grama.

MARIN et al.<sup>69</sup> obtiveram 0,4% de bromelina do extrato de caules de abacaxizeiro através de precipitação por sulfato de amônio e por acetona; a atividade da enzima obtida foi aumentada pela adição de versene (EDTA) ou cianeto de sódio, enquanto que a de ácidos cítrico e glucônico inativaram a bromelina.

A separação da bromelina de caules de abacaxizeiro de 2-3 anos de idade foi feita após o congelamento do material descascado e cortado em fatias. Após o descongelamento, as fatias foram prensadas e o valor do pH do extrato foi ajustado em 5,0. Após centrifugação, a solução sobrenadante límpida foi resfriada a 10°C e para cada litro de solução foram adicionados 5 g de ácido tânico. O resíduo foi separado, lavado com acetona e secado sob vácuo. A recuperação da enzima foi de 82,6%<sup>55</sup>.

O teor de bromelina extraída de várias partes da planta de abacaxizeiro foi de 0,08% de frutos, 0,06% de haste, 0,075% de casca e 0,1-0,6% de caules; as folhas renderam ínfima quantidade de bromelina. A bromelina do

caule apresentou atividade por grama de 1.000-5.000 unidades de coagulação de leite e a da fruta de 500-900 unidades<sup>75</sup>.

Amplio estudo sobre o teor de bromelina em diferentes partes de 3 diferentes variedades de abacaxizeiro foi realizado por SUBRAMANIAN et al.<sup>102</sup>, utilizando sulfato de amônio, acetona e álcool etílico como precipitantes. A pesquisa revelou que o cultivar pérola forneceu maior teor de bromelina por kg de caules, frutos verdes e maduros, quando precipitada por sulfato de amônio. O cultivar Smooth cayenne forneceu maior teor de bromelina por precipitação por acetona e por álcool etílico. O resfriamento do extrato a 0 - 3°C antes da precipitação com álcool etílico forneceu maior rendimento em bromelina que idêntico tratamento a 24 - 26°C. O rendimento de bromelina, expresso em g/kg de caules foi de 2,26, 2,45 e 1,77 para os cultivares pérola, Smooth cayenne e Jupi, respectivamente.

A bromelina extraída de abacaxizeiro cultivar pérola, foi obtida após congelamento de caules descascados, utilizando-se acetona como agente precipitante. O rendimento em pó seco liofilizado foi de 1,3%<sup>66</sup>.

## 2.5. Estabilização, inibição e ativação

A preparação industrial de enzimas tem se defrontado com os reconhecidos problemas de estabilidade

frente ao calor, diferentes valores de pH, presença de cátions metálicos, agentes oxidantes e inibidores.

É difícil estabelecer, de modo específico e sistemático, todos os fatores que causam redução da atividade de uma enzima ou de uma classe de enzimas no decorrer do tempo.

Até cerca de duas décadas atrás, as tentativas de estabilização da bromelina estavam centradas na incorporação de compostos redutores e de substâncias complexantes de cátions metálicos. As técnicas de preparação industrial de bromelina registravam a adição de substâncias auxiliares durante o processo ou a incorporação das mesmas nos preparados finais para manter a atividade dentro dos limites do padrão de uso. As quantidades dessas substâncias foram estabelecidas por testes experimentais.

O tiosulfato de sódio demonstrou ser um agente ativador da bromelina e de outras enzimas proteolíticas<sup>59</sup>.

Produtos de hidrólise de gelatina acidificados com ácidos clorídrico, ou fosfórico ou láctico, estabilizam preparações farmacêuticas injetáveis de bromelina<sup>74</sup>.

O ion benzoato estabilizou a bromelina na concentração de 0,001M em valores de pH entre 3,5-5,0 e na

concentração de 0,1M para valores de pH superiores a 6,0<sup>46</sup>.

Bromelina, papaína e ficina, em soluções diluídas mantiveram-se estáveis por cerca de 60 dias quando se utilizou 35-60% de glicerol e 0,1-1,0% de colágeno parcialmente hidrolizado<sup>24</sup>.

Preparações contendo bromelina foram ativadas e estabilizadas com o emprego de acetato de chumbo, cloreto de chumbo, cloreto de bário, cloreto de cálcio, cloreto de estrôncio e sulfato de magnésio. A cisteína e ácido tiomálico exaltaram o efeito ativador, mantendo a bromelina estável e ativa por 50 dias a 40°C<sup>42</sup>.

Bromelina purificada sofreu ativação quando tratada a 50°C com ion cianeto, cisteína, 2,3-dimercaptopropanol, e mais eficientemente com cisteína e ácido etilendiaminotetracético<sup>78</sup>.

Recentemente, várias pesquisas tem demonstrado que o processo de estabilização e ativação da bromelina está ligado à presença de inibidores da atividade enzimática, presentes no produto final obtido pelos métodos tradicionais<sup>5,60,84,88</sup>. Os inibidores são polipeptídeos com peso molecular 5.600, de composição similares entre si, porém cromatograficamente distintos. Estes isoinibidores contém 5 ligações dissulfeto e cerca de 50 aminoácidos<sup>84</sup>. A análise da estrutura primária de 1 dos 7 inibidores revelou extensa



microheterogeneidade. Cada molécula do inibidor estudado era composta de duas cadeias peptídicas interligadas por uma ligação dissulfeto. Os inibidores diferiram entre si pelo número de resíduos de aminoácidos em cada cadeia e também pelo tipo de aminoácido terminal. Em função da semelhança dos resíduos de cisteína com aqueles de outros inibidores de proteases, supõe-se que os inibidores da bromelina são gerados enzimaticamente de precursores de cadeia simples por ruptura de uma "ponte" peptídica que liga o NH<sub>2</sub>-terminal da cadeia A a um COOH-terminal da cadeia B<sup>88</sup>.

A inibição da atividade proteolítica da bromelina pode estar relacionada com produtos de reação amarronzados de quercentina que existem em plantas, conforme comprovado com o ácido protocatechuico ou floroglucinol<sup>56,77</sup>.

Estudos laboratoriais relataram a inibição da atividade proteolítica da bromelina por peptídeo da epiderme humana<sup>106</sup>, derivado cloroacetilado de peptídeo<sup>113</sup>, glicoproteína obtida de tubérculos de batatas<sup>122</sup>, inibidor de tripsina de soja<sup>107</sup>, inibidor de tiol-proteinases produzido por Aspergillus niger<sup>117</sup>, peptídeos de látex de Carica papaya L.<sup>5</sup>, e substâncias protéicas encontradas na urina humana<sup>103</sup>.

### 3. USOS

A bromelina tem sido predominantemente utilizada em medicamentos e na tecnologia de alimentos.

#### 3.1. Usos clínicos e para-médicos

O emprego da bromelina para fins terapêuticos<sup>30,67,95,108</sup>, tem sido preconizado em vários campos da medicina, como fármaco:

- antiinflamatório nos processos edematosos<sup>33,96</sup>.
- mucolítico nas afecções bronco-pulmonares<sup>1,4,39</sup>.
- coadjuvante no tratamento de processos infecciosos, em associação com antibióticos<sup>3,21</sup>.
- auxiliar da digestão, na terapia de substituição<sup>15,22,48</sup>.
- como auxiliar no processo de tipagem sanguínea<sup>65,85,86</sup>.
- agente de limpeza de lentes de contacto<sup>12</sup>.
- agente de remoção de crostas de feridas em cicatrização<sup>38</sup>.
- componente em tónicos para cabelos<sup>104</sup>.

- agente potencial na prevenção e tratamento do câncer<sup>9,70,109,110,111</sup>.

### 3.2. Usos na tecnologia de alimentos

Enzimas proteolíticas encontram diversas aplicações em processos tecnológicos de alimentos, principalmente em:

- amaciamento de carnes<sup>6,10,16,20,52,61,62,63, 92,112,116,118</sup>.
- solubilização de proteínas bovina, de peixes e de cereais<sup>2,7,8,13,19,23,26,29,32,37,41,47,49, 50,51,53,76,82,91,94,99,114,121</sup>.
- coagulação de leite para a fabricação de queijos<sup>14,57,72,87,89</sup>.
- panificação<sup>17,101</sup>.
- obtenção de produtos de ovos de galinha e como ingrediente de ração para aves<sup>18,40,73</sup>.
- processos fermentativos e na clarificação de cervejas<sup>11,115,119</sup>.
- clarificação de sucos de frutas e de vegetais<sup>71</sup>.

#### 4. PROPOSIÇÃO

A identificação e reconhecimento dos fatores ou dos agentes responsáveis pela inativação de enzimas tem permitido estabelecer procedimentos e métodos capazes de impedir parcialmente os efeitos inibidores exercidos sobre preparações enzimáticas.

A simples manutenção da atividade enzimática, durante um certo intervalo de tempo, é denominada estabilização enzimática. Muitas vezes consegue-se, através de um bloqueio da ação de inibidores, uma exaltação da atividade enzimática a qual é denominada ativação.

Sob o ponto de vista tecnológico é de especial significado o fato de se conseguir utilizar técnicas capazes de promoverem balanços materiais superavitários na preparação de enzimas.

Essas técnicas que promovem estabilização e ativação enzimática permitem obter compostos com menor custo industrial. Isto possibilitaria uma ampliação da gama de aplicações desses compostos.

Com a finalidade de avaliar a aplicação de recursos que promovem estabilização e ativação da bromelina de caules de abacaxizeiro, elaborou-se um plano de pesquisas com o objetivo de demonstrar que :

- o uso de certos agentes químicos adicionados ao extrato de caules de abacaxizeiro exercem efeito ativante e estabilizante da bromelina, possibilitando o armazenamento do mesmo ;
- o tratamento térmico do extrato de caules de abacaxizeiro é um fator que influi na ativação e na estabilização da bromelina ;
- os agentes tradicionalmente utilizados para a precipitação da bromelina bruta promovem diferenças no balanço material e na estabilidade da enzima quando se combinam com os fatores temperatura e substâncias ativadoras.

## 5. MATERIAIS, MÉTODOS E PARTE EXPERIMENTAL

Utilizou-se caules de abacaxizeiro Ananas comosus (L.) Merr. cultivar Cayenne, de 30 meses de idade, os quais foram colhidos após cerca de 10 meses da remoção dos frutos.

A coleta foi feita na Fazenda Suzuki, em Baurú, Estado de São Paulo.

Os caules foram removidos do solo e em seguida procedeu-se à retirada das folhas ainda existentes.

A preparação do material para a realização da parte experimental foi feita em etapas, conforme descrição que se seguem :

### 5.1. Limpeza

O processo de limpeza consistiu em remover completamente a casca externa dos caules por meio de facão. Nesta operação foram também removidas as raízes e o pedúnculo de cada caule.

### 5.2. Moagem

Os caules limpos foram moídos em moinho granulador TREU, na velocidade de 900 rpm, sem utilização de tamis. O material moído se apresentou com fragmentos de tamanhos variáveis de cerca de 2 a 10 mm.

### 5.3. Prensagem

O material moído foi imediatamente submetido a prensagem na prensa hidráulica Agenzia Enologica Italiana à pressão de 150-200 bar.

O extrato obtido por prensagem foi recolhido em baldes de plástico para decantação do amido e de resíduos sólidos. Após decantação, o líquido sobrenadante foi transferido para bombonas plásticas que foram armazenadas em câmara frigorífica a 5°C.

### 5.4. Tratamento térmico, filtração e ativação

#### 5.4.1. Preparação de amostras para estudo do efeito de ativadores

Ao extrato decantado foi adicionado 1% de auxiliar de filtração dicalite 477, aquecido a 50°C, e a seguir filtrado em Büchner à vácuo através de papel de filtro S&S faixa preta contendo uma camada de pré-filtro de dicalite 477 de aproximadamente 15 mm de espessura. O extrato filtrado foi resfriado à temperatura ambiente.

#### Prova 1

Dois litros de extrato filtrado foram distribuídos em frascos de 100 ml, fechados com tampa hermética e armazenados em armários a 20°C e em geladeira a 5°C.

## Prova 2

A 2 litros de extrato filtrado adicionou-se pela ordem, sob agitação mecânica,

Benzoato de sódio ..... 6 g

Cloridrato de cisteína ..... 1 g

mantendo-se a agitação até a dissolução completa das substâncias.

A solução foi distribuída em frascos de 100 ml, fechados com tampa hermética e armazenados em armários a 20°C e em geladeira a 5°C.

## Prova 3

A 2 litros de extrato filtrado adicionou-se pela ordem, sob agitação mecânica,

Benzoato de sódio ..... 6 g

Cloridrato de cisteína ..... 1 g

Edetato dissódico ..... 4 g

matendo-se a agitação até a dissolução completa das substâncias.

A solução foi distribuída em frascos de 100 ml, fechados com tampa hermética e armazenados em armários a 20°C e em geladeira a 5°C.



5.4.2. Preparação de amostras para estudo do efeito da temperatura de filtração, dos ativadores e dos agentes precipitantes, no balanço material e na estabilidade do extrato e da bromelina

5.4.2.1. Provas da série A com aquecimento do extrato a 20°C

A 5,0 l de extrato decantado adicionou-se 50g de dicalite 477 e se aqueceu a 20°C por 10 minutos. A seguir filtrou-se em Büchner à vácuo com papel de filtro S&S faixa preta e uma camada de pré-filtro de dicalite 477 de aproximadamente 15 mm de espessura. Da solução filtrada foram separadas duas porções de 2,2 l.

Da 1ª parte retirou-se 200 ml, que foram fracionados em 4 frascos de 50 ml, destinados ao estudo de estabilidade nas temperaturas de 5°C, 20°C, 30°C e 40°C. Estas amostras foram identificadas como E-AI.

A solução restante foi dividida em duas porções de 1,0 l cada, que foram a seguir precipitadas com acetona e sulfato de amônio, conforme os seguintes procedimentos :

#### Precipitado com acetona

A 1,0 l de extrato filtrado foram adicionados 3,0 l de acetona, sob intensa agitação. A bromelina precipitada ficou em repouso por cerca de 30 minutos. A seguir filtrou-se em Büchner com papel de filtro tipo S&S faixa preta, sob vácuo de trompa de água. O produto recolhido no filtro foi lavado com cerca de 250 ml de acetona e finalmente com cerca de 100 ml de éter etílico. A bromelina separada foi tamisada sucessivamente em tamises de 12, 40 e 60 mesh e a seguir secada em estufa com ventilação de ar aquecido a 45°C por cerca de 3 horas. A bromelina foi identificada como A-I.

#### Precipitação com sulfato de amônio

A 1,0 l de extrato filtrado foram adicionados 500 g de sulfato de amônio, sob intensa agitação. a bromelina precipitada ficou em repouso por cerca de 30 minutos. A seguir filtrou-se em Büchner com papel de filtro tipo S&S faixa preta, sob vácuo de trompa de água, até o máximo de esgotamento das águas-mãe de precipitação. A massa obtida foi secada em estufa com ventilação de ar aquecido a 45°C por 15 horas e a seguir tamisada em tamis de 60 mesh. A bromelina obtida foi identificada como A-II.

A 2,2 l da 2ª parte foram adicionados pela ordem e sob agitação,

Benzoato de sódio .....	6,6 g
Cloridrato de cisteína .....	1,1 g
Edetato dissódico .....	4,4 g

mantendo-se a agitação até a completa dissolução das substâncias.

Da 2ª parte retirou-se 200 ml, que foram fracionados em 4 frascos de 50 ml, destinados ao estudo de estabilidade nas temperaturas de 5°C, 20°C, 30°C e 40°C. Estas amostras foram identificadas como E-AII.

Os 2,0 l restantes foram divididos em duas porções de 1,0 l cada, a seguir precipitadas com acetona e sulfato de amônio, conforme os procedimentos anteriormente descritos; as bromelinas obtidas foram identificadas por A-III e A-IV, respectivamente.

#### 5.4.2.2. Provas da série B com aquecimento do extrato a 30°C

A 5,0 l de extrato decantado adicionou-se 50g de dicalite 477 e se aqueceu a 30°C por 10 minutos. A seguir filtrou-se em Büchner à vácuo com papel de filtro S&S faixa preta e uma camada de pré-filtro de dicalite 477 de aproximadamente 15 mm de espessura. Da solução filtrada foram separadas duas porções de 2,2 l.

Da primeira parte retirou-se 200 ml, que foram fracionados em 4 frascos de 50 ml, os quais foram destinados ao estudo de estabilidade nas temperaturas de 5°C, 20°C, 30°C e 40°C. Estas amostras foram identificadas como E-BI.

A solução restante foi dividida em duas porções de 1,0 l cada, a seguir precipitadas com acetona e sulfato de amônio, conforme os seguintes procedimentos :

#### Precipitação com acetona

A 1,0 l de extrato filtrado foram adicionados 3,0 l de acetona, sob intensa agitação. A bromelina precipitada ficou em repouso por cerca de 30 minutos. A seguir filtrou-se em Büchner com papel de filtro tipo S&S faixa preta, sob vácuo de trompa de água. O produto recolhido no filtro foi lavado com cerca de 250 ml de acetona e finalmente com cerca de 100 ml de éter etílico. A bromelina separada foi tamisada sucessivamente em tamises de 12, 40 e 60 mesh e a seguir secada em estufa com ventilação de ar aquecido a 45°C por cerca de 3 horas. A bromelina obtida foi identificada como B-I.

#### Precipitação com sulfato de amônio

A 1,0 l de extrato filtrado foram adicionados 500 g de sulfato de amônio, sob intensa agitação. A bromelina precipitada ficou em repouso por cerca de 30

minutos. A seguir filtrou-se em Büchner com papel de filtro tipo S&S faixa preta, sob vácuo de trompa de água, até o máximo esgotamento das águas-mãe de precipitação. A massa obtida foi secada em estufa com ventilação de ar aquecido a 45°C por 12 horas e a seguir tamisada em tamis de 60 mesh. A bromelina obtida foi identificada como B-II.

Aos 2,2 l da 2ª parte foram adicionados pela ordem e sob agitação,

Benzoato de sódio .....	6,6 g
Cloridrato de cisteína .....	1,1 g
Edetato dissódico .....	4,4 g

mantendo-se a agitação até a completa dissolução das substâncias.

Desta solução retirou-se 200 ml, que foram fracionados em 4 frascos de 50 ml, destinados ao estudo de estabilidade nas temperaturas de 5°C, 20°C, 30°C e 40°C. Estas amostras foram identificadas como E-BII.

Os 2,0 l restantes foram divididos em duas porções de 1,0 l cada, a seguir precipitadas com acetona e sulfato de amônio, conforme os procedimentos anteriormente descritos; as bromelinas obtidas foram identificadas por B-III e B-IV, respectivamente.

#### 5.4.2.3. Provas da série C com aquecimento do extrato a 40°C

A 5,0 l de extrato decantado adicionou-se 50g de dicalite 477 e se aqueceu a 40°C por 10 minutos. A seguir filtrou-se em Büchner à vácuo com papel de filtro S&S faixa preta e uma camada de pré-filtro de dicalite 477 de aproximadamente 15 mm de espessura. Da solução filtrada foram separadas duas porções de 2,2 l.

Da primeira parte retirou-se 200 ml, que foram fracionados em 4 frascos de 50 ml, destinados ao estudo de estabilidade nas temperaturas de 5°C, 20°C, 30°C e 40°C. Estas amostras foram identificadas como E-CI.

Os 2,0 l restantes foram divididos em duas porções de 1,0 l cada, a seguir precipitadas com acetona e sulfato de amônio, conforme os seguintes procedimentos :

##### Precipitação com acetona

A 1,0 l de extrato filtrado foram adicionados 3,0 l de acetona, sob intensa agitação. A bromelina precipitada ficou em repouso por cerca de 30 minutos. A seguir filtrou-se em Büchner com papel de filtro tipo S&S faixa preta, sob vácuo de trompa de água. O produto recolhido no filtro foi lavado com cerca de 250 ml de acetona e finalmente com cerca de 100 ml de éter etílico. A bromelina separada foi tamisada sucessivamente em tamises de

12, 40 e 60 mesh e a seguir secada em estufa com ventilação de ar aquecido a 45°C por cerca de 3 horas. A bromelina obtida foi identificada como C-I.

#### Precipitação com sulfato de amônio

A 1,0 l de extrato filtrado foram adicionados 500 g de sulfato de amônio, sob intensa agitação. A bromelina precipitada ficou em repouso por cerca de 30 minutos. A seguir filtrou-se em Büchner com papel de filtro tipo S&S faixa preta, sob vácuo de trompa de água, até o máximo esgotamento das águas-mãe de precipitação. A massa obtida foi secada em estufa com ventilação de ar aquecido a 45°C por 12 horas e a seguir tamisada em tamis de 60 mesh. A bromelina obtida foi identificada como C-II.

Aos 2,2 l da 2ª parte foram adicionados pela ordem e sob agitação,

Benzoato de sódio .....	6,6 g
Cloridrato de cisteína .....	1,1 g
Edetato dissódico .....	4,4 g

mantendo-se a agitação até a completa dissolução das substâncias.

Desta solução retirou-se 200 ml, que foram fracionados em 4 frascos de 50 ml, destinados ao estudo de estabilidade nas temperaturas de 5°C, 20°C, 30°C e 40°C. Estas amostras foram identificadas como C-EII.

Os 2,0 l restantes foram divididos em duas porções de 1,0 l cada, a seguir precipitadas com acetona e sulfato de amônio, conforme os procedimentos anteriormente descritos; as bromelinas obtidas foram identificadas por C-III e C-IV, respectivamente.

#### 5.4.2.4. Provas da série D com aquecimento do extrato a 50°C

A 5,0 l de extrato decantado adicionou-se 50g de dicalite 477 e se aqueceu a 50°C por 10 minutos. A seguir filtrou-se em Büchner à vácuo com papel de filtro S&S faixa preta e uma camada de pré-filtro de dicalite 477 de aproximadamente 15 mm de espessura. Da solução filtrada foram separadas duas porções de 2,2 l.

Da primeira parte retirou-se 200 ml, que foram fracionados em 4 frascos de 50 ml, destinados ao estudo de estabilidade nas temperaturas de 5°C, 20°C, 30°C e 40°C. Estas amostras foram identificadas como E-DI.

Os 2,0 l restantes foram divididos em duas porções de 1,0 l cada, a seguir precipitadas com acetona e sulfato de amônio, conforme os seguintes procedimentos :



### Precipitação com acetona

A 1,0 l de extrato filtrado foram adicionados 3,0 l de acetona, sob intensa agitação. A bromelina precipitada ficou em repouso por cerca de 30 minutos. A seguir filtrou-se em Büchner com papel de filtro tipo S&S faixa preta, sob vácuo de trompa de água. O produto recolhido no filtro foi lavado com cerca de 250 ml de acetona e finalmente com cerca de 100 ml de éter etílico. A bromelina separada foi tamisada sucessivamente em tamises de 12, 40 e 60 mesh e a seguir secada em estufa com ventilação de ar aquecido a 45°C por cerca de 3 horas. A bromelina obtida foi identificada como D-I.

### Precipitação com sulfato de amônio

A 1,0 l de extrato filtrado foram adicionados 500 g de sulfato de amônio, sob intensa agitação. A bromelina precipitada ficou em repouso por cerca de 30 minutos. A seguir filtrou-se em Büchner com papel de filtro tipo S&S faixa preta, sob vácuo de trompa de água, até o máximo esgotamento das águas-mãe de precipitação. A massa obtida foi secada em estufa com ventilação de ar aquecido a 45°C por 12 horas e a seguir tamisada em tamis de 60 mesh. A bromelina obtida foi identificada como D-II.

Aos 2,2 l da 2ª parte foram adicionados pela ordem e sob agitação,

Benzoato de sódio .....	6,6 g
Cloridrato de cisteína .....	1,1 g
Edetato dissódico .....	4,4 g

mantendo-se a agitação até a completa dissolução das substâncias.

Desta solução retirou-se 200 ml, que foram fracionados em 4 frascos de 50 ml, destinados ao estudo de estabilidade nas temperaturas de 5°C, 20°C, 30°C e 40°C. Estas amostras foram identificadas como C-EII.

Os 2,0 l restantes foram divididos em duas porções de 1,0 l cada, a seguir precipitadas com acetona e sulfato de amônio, conforme os procedimentos anteriormente descritos; as bromelinas obtidas foram identificadas por D-III e D-IV, respectivamente.

#### 5.4.2.5. Provas da série E com aquecimento do extrato a 60°C

A 5,0 l de extrato decantado adicionou-se 50g de dicalite 477 e se aqueceu a 60°C por 10 minutos. A seguir filtrou-se em Büchner à vácuo com papel de filtro S&S faixa preta e uma camada de pré-filtro de dicalite 477 de aproximadamente 15 mm de espessura. Da solução filtrada foram separadas duas porções de 2,2 l.

Da primeira parte retirou-se 200 ml, que foram fracionados em 4 frascos de 50 ml, destinados ao estudo de estabilidade nas temperaturas de 5°C, 20°C, 30°C e 40°C. Estas amostras foram identificadas como E-EI.

Os 2,0 l restantes foram divididos em duas porções de 1,0 l cada, a seguir precipitadas com acetona e sulfato de amônio, conforme os seguintes procedimentos :

#### Precipitação com acetona

A 1,0 l de extrato filtrado foram adicionados 3,0 l de acetona, sob intensa agitação. A bromelina precipitada ficou em repouso por cerca de 30 minutos. A seguir filtrou-se em Büchner com papel de filtro tipo S&S faixa preta, sob vácuo de trompa de água. O produto recolhido no filtro foi lavado com cerca de 250 ml de acetona e finalmente com cerca de 100 ml de éter etílico. A bromelina separada foi tamisada sucessivamente em tamises de 12, 40 e 60 mesh e a seguir secada em estufa com ventilação de ar aquecido a 45°C por cerca de 3 horas. A bromelina obtida foi identificada como E-I.

#### Precipitação com sulfato de amônio

A 1,0 l de extrato filtrado foram adicionados 500 g de sulfato de amônio, sob intensa agitação. A bromelina precipitada ficou em repouso por cerca de 30 minutos. A seguir filtrou-se em Büchner com papel de filtro

tipo S&S faixa preta, sob vácuo de trompa de água, até o máximo esgotamento das águas-mãe de precipitação. A massa obtida foi secada em estufa com ventilação de ar aquecido a 45°C por 12 horas e a seguir tamisada em tamis de 60 mesh. A bromelina obtida foi identificada como E-II.

Aos 2,2 l da 2ª parte foram adicionados pela ordem e sob agitação,

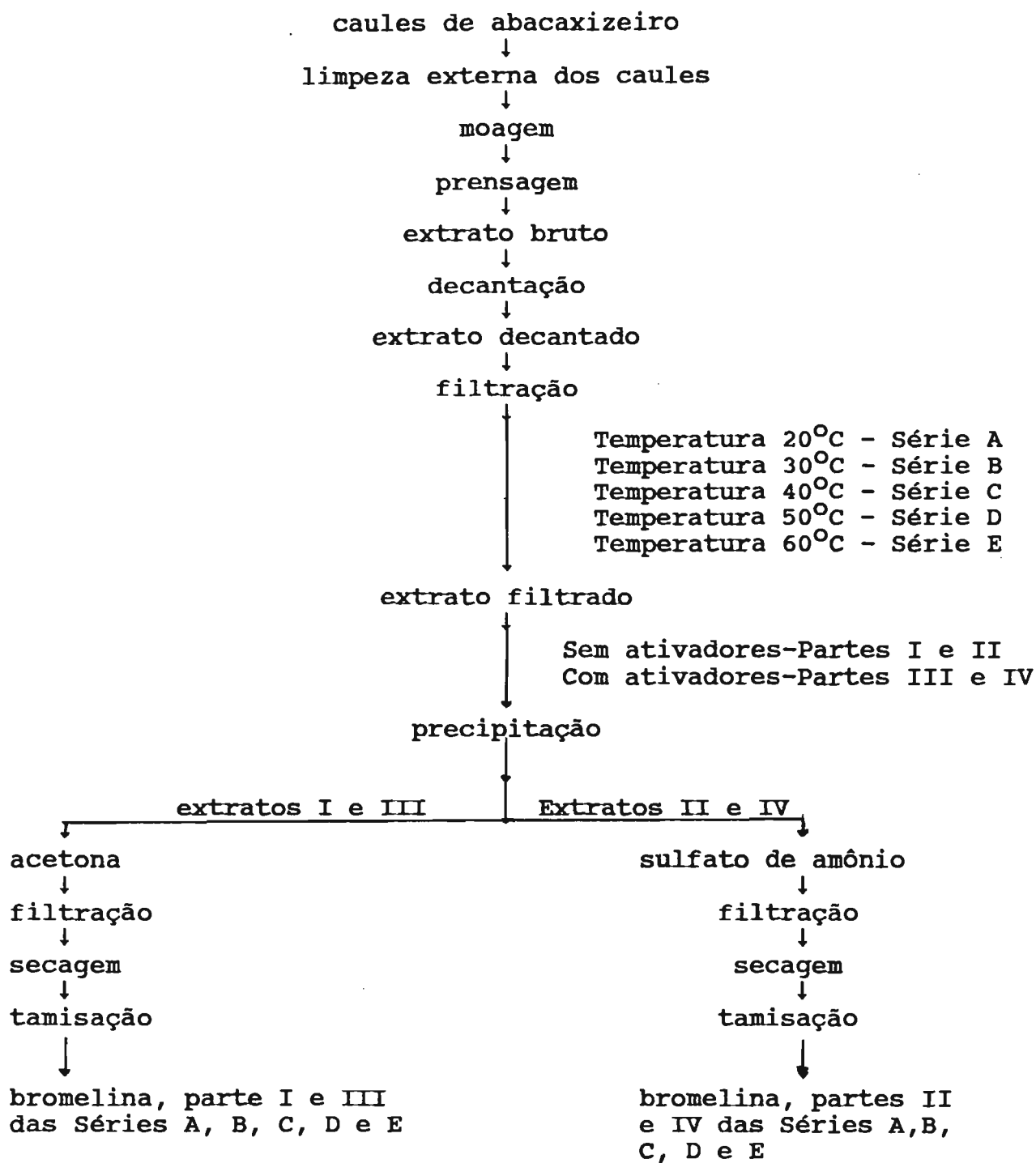
Benzoato de sódio .....	6,6 g
Cloridrato de cisteína .....	1,1 g
Edetato dissódico .....	4,4 g

mantendo-se a agitação até a completa dissolução das substâncias.

Desta solução retirou-se 200 ml, que foram fracionados em 4 frascos de 50 ml, destinados ao estudo de estabilidade nas temperaturas de 5°C, 20°C, 30°C e 40°C. Estas amostras foram identificadas como E-EII.

Os 2,0 l restantes foram divididos em duas porções de 1,0 l cada, a seguir precipitadas com acetona e sulfato de amônio, conforme os procedimentos anteriormente descritos; as bromelinas obtidas foram identificadas por E-III e E-IV, respectivamente.

## 5.5. Esquema geral das provas



## 5.6. Determinação da atividade proteolítica

A determinação da atividade proteolítica do extrato de abacaxizeiro e da bromelina em pó seco foi realizada pelo método Kunitz<sup>64</sup> adaptado à técnica CP-test<sup>36</sup>.

### 5.6.1. Princípio do método

O método de Kunitz avalia a atividade proteolítica através da digestão da caseína em condições controladas de valores de pH, variável para cada enzima, através da determinação dos produtos solúveis em ácido tricloroacético por espectrofotometria na região do ultravioleta.

O CP-test utiliza caseína como substrato em gel de agar, avaliando a atividade proteolítica através do halo de digestão do substrato, em comparação com um padrão de referência.

### 5.6.2. Solução tampão pH 7,6

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	2,210 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .....	17,100 g
Água destilada q.s.p. ....	2000 ml

Pesar exatamente os componentes da fórmula e dissolver em água destilada, levando a volume de 2000 ml. Determinar o valor do pH da solução em potenciômetro a 25°C.

### 5.6.3. Substrato sólido para as placas

O meio para a determinação em placas de Petri é preparado com a fórmula e técnicas a seguir descritas :

Caseína seg. Hammarsten Merck (Art. 2242) ....	10g
Agar Merck (Art. 1613) .....	25g
Tampão fosfato pH 7,6 q.s.p. ....	1000 ml

Separadamente, dissolver a quente a caseína em 500 ml de tampão fosfato e o agar nos restantes 500 ml, também sob aquecimento. Misturar as soluções, agitar até a completa homogeneização. Filtrar através de filtro de gaze e resfriar a 45°C.

### 5.6.4. Preparação das placas

Verter em placas de Petri (20 x 160 mm) 50 ml do meio preparado de acordo com o item 5.6.3. Colocar as placas sobre uma superfície plana e deixar solidificar. A seguir, perfurar o agar com um furador de 8 mm de diâmetro, perfazendo um total de 9 cavidades em cada placa. Usar 3 placas para cada ensaio.

### 5.6.5. Preparação do padrão

Pesar exatamente o equivalente a 400 unidades Kunitz (U.K.) da bromelina padrão e transferir

quantitativamente para um balão volumétrico de 100 ml, adicionar aproximadamente 50 ml de tampão fosfato pH 7,6, deixar agitando até a completa dissolução. Completar o volume com o mesmo tampão. A concentração obtida é de 4 U.K./ml, que corresponde ao ponto do padrão de maior concentração =  $YS_2$ . Para preparar o padrão de menor concentração tomar uma alíquota de 10 ml da concentração  $YS_2$  e levar a volume de 20 ml com o tampão fosfato pH 7,6. A concentração obtida é de 2 U.K./ml, que corresponde ao padrão  $YS_1$ .

#### **5.6.6. Preparação da amostra**

##### **5.6.6.1. Extrato**

Pipetar exatamente 10 ml de extrato filtrado (aproximadamente 20 U.K./ml), transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 50 ml, adicionar 0,5 ml de solução a 0,1% de benzoato de sódio e completar o volume com tampão fosfato pH 7,6. Concentração aproximada da amostra: 4 U.K./ml.

##### **5.6.6.2. Bromelina (amostra)**

Pesar exatamente uma quantidade de bromelina a ser analisada que contenha cerca de 400 U.K., transferir para um bequer e juntar 20 ml de solução tampão fosfato pH 7,6; agitar com bastão de vidro e transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 100 ml,



juntar 50 ml de solução tampão fosfato pH 7,6 e deixar sob agitação até a completa dissolução da amostra. Completar o volume com o mesmo tampão. Concentração aproximada da amostra: 4 U.K./ml.

#### 5.6.7. Realização do ensaio

Com "microdispenser", pipetar 50 ul do padrão  $YS_1$  em 3 cavidades, 50 ul do padrão  $YS_2$  em 3 cavidades e 50 ul da amostra nas outras 3 cavidades do meio. Deixar em repouso, à temperatura ambiente, por 30 minutos. Incubar as placas a  $35^{\circ}C$  durante 20 horas. Ao término deste intervalo de tempo medir em mm o diâmetro do halo de digestão da caseína, delimitado por um anel de precipitação de paracaseína, tanto para as concentrações do padrão quanto para a amostra.

#### 5.6.8. Cálculo

O cálculo foi feito através de interpolação numa reta padrão, elaborada a partir de diâmetros de halos de digestão da caseína em função do logaritmo da concentração da bromelina (Enzyme Development Co.), utilizada como padrão.

## 5.7. Identificação

A identificação da bromelina extraída por precipitação com acetona e com sulfato de amônio foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).

### 5.7.1. Preparação das amostras e do padrão

Pesar exatamente 2 mg de amostra de bromelina em pó e dissolver em solução de sacarose a 40% contendo azul de bromofenol (BPB - 0,2mM), de modo a se obter uma concentração de 2 mg/200 $\mu$ l.

Proceder de modo idêntico com bromelina padrão Sigma.

### 5.7.2. Preparação do gel de poliacrilamida

A preparação do gel de poliacrilamida foi feita de acordo com o método de DAVIS & ORNSTEIN<sup>28</sup>, utilizando-se tubos de 70 mm de comprimento por 7 mm de diâmetro.

### 5.7.3. Separação eletroforética

Aplicar 20-50  $\mu$ l de solução de amostra sobre o gel de poliacrilamida (uma amostra para cada tubo) e submeter o conjunto a uma tensão de 1 mA/tubo, até a penetração da amostra no gel de separação. A seguir aumentar

para 2 mA/tubo, até se atingir uma migração do corante indicador próximo à extremidade do tubo (cerca de 5 mm).

#### 5.7.4. Coloração e descoloração

Imergir o gel de poliacrilamida em solução a 2% de azul brilhante de Coomassie - R-250, e deixar em repouso por 2 horas. Após esse período, lavar o gel com banhos descolorantes, até se eliminar o excesso de azul brilhante de Coomassie R-250.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os processos clássicos de insolubilização de proteínas e de enzimas proteolíticas estão baseados no emprêgo do sulfato de amônio e da acetona.

A principal preocupação dos pesquisadores tem sido a elaboração de técnicas que permitam obter bromelina com a maior eficiência possível, tentando impedir a influência de inibidores naturais e controlando os fatores que reconhecidamente promovem um balanço material deficitário.

Os conhecimentos adquiridos nas últimas duas décadas acerca dos inibidores e dos fatores que bloqueiam o sítio ativo da bromelina possibilitam novas indagações. O desenvolvimento de técnicas que procurem evitar, no início do processo extrativo, a influência dos inibidores e dos fatores poderá resultar em metodologia capaz de promover um processo de obtenção superavitário. Em consequência, o produto obtido poderá apresentar maior atividade específica, bem como maior estabilidade, além de menor custo.

Os benefícios decorrentes de processos tecnológicos aprimorados justificam pesquisas que comprovem hipóteses originais.

Os objetivos desta pesquisa visaram avaliar: a influência de benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e

edetato dissódico sobre a atividade proteolítica do extrato de caules de abacaxizeiro; o efeito da temperatura do extrato sobre a atividade proteolítica e a influência dos agentes clássicos de insolubilização da bromelina, acetona e sulfato de amônio, no balanço material.

#### 6.1. Ativação e estabilização da atividade proteolítica do extrato

O uso de ativantes e estabilizantes da atividade proteolítica da bromelina tem sido preconizado sobre a enzima isolada. Supõe-se que todas as precauções reconhecidas como importantes sejam tomadas para a manutenção da atividade proteolítica durante o processo.

O objetivo estabelecido para este item visou avaliar a eficiência do benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e edetato dissódico sobre a ativação e estabilização do extrato de caules de abacaxizeiro, logo após o processo de prensagem e filtração.

Em base a experimentos preliminares que comprovaram a dificuldade de purificação do extrato, somente viável a temperaturas acima de 40°C e, considerando-se que a filtração em temperaturas superiores a 50°C promovem perda da atividade proteolítica, optou-se pela realização de ensaio de ativação de extrato filtrado a 50°C.

A tabela I relaciona os valores determinados da atividade proteolítica de extratos filtrados a 50°C, durante um período de 60 dias, armazenados a 5 e 20°C, sem ativadores (prova 1), com benzoato de sódio e cloridrato de cisteína (prova 2) e com benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e edetato dissódico (prova 3).

As fig. 1, 2 e 3, reproduzem em gráficos os resultados da tabela I.

**Tabela I. Atividade proteolítica em U.K./ml e valores de pH de extratos filtrados a 50°C, após 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 dias, armazenados a 5 e 20°C.**

**Prova 1 - sem ativadores; prova 2 com benzoato de sódio e cloridrato de cisteína; prova 3 com benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e edetato dissódico.**

Tempo de armazem	Ensaio	PROVA 1		PROVA 2		PROVA 3	
		5°C	20°C	5°C	20°C	5°C	20°C
0 dias	Atividade UK/ml	13,0	13,0	16,9	16,9	18,5	18,5
	Valor de pH	4,2	4,2	3,8	3,8	4,0	4,0
5 dias	Atividade UK/ml	12,8	12,6	14,6	16,7	19,6	18,6
	Valor de pH	4,4	4,3	4,6	3,8	4,0	4,0
10 dias	Atividade UK/ml	11,0	9,6	13,4	15,9	18,5	18,1
	Valor de pH	4,2	4,1	4,6	3,8	4,0	4,0
15 dias	Atividade UK/ml	8,0	8,5	9,0	13,5	17,5	17,2
	Valor de pH	4,2	4,0	4,5	3,7	4,0	4,0
20 dias	Atividade UK/ml	8,0	7,5	8,3	13,9	18,2	17,7
	Valor de pH	4,1	3,9	4,6	3,7	4,6	4,6
30 dias	Atividade UK/ml	8,5	8,5	8,8	14,9	19,6	18,3
	Valor de pH	3,8	3,8	4,5	3,7	4,1	4,1
40 dias	Atividade UK/ml	9,0	8,8	10,4	12,7	18,6	17,8
	Valor de pH	3,9	3,8	4,4	3,8	4,1	4,0
50 dias	Atividade UK/ml	8,0	9,0	12,1	12,0	19,3	18,1
	Valor de pH	3,8	3,8	4,3	4,3	4,1	4,3
60 dias	Atividade UK/ml	7,5	8,5	9,3	11,0	17,7	17,2
	Valor de pH	3,8	3,8	4,2	3,8	4,1	4,1

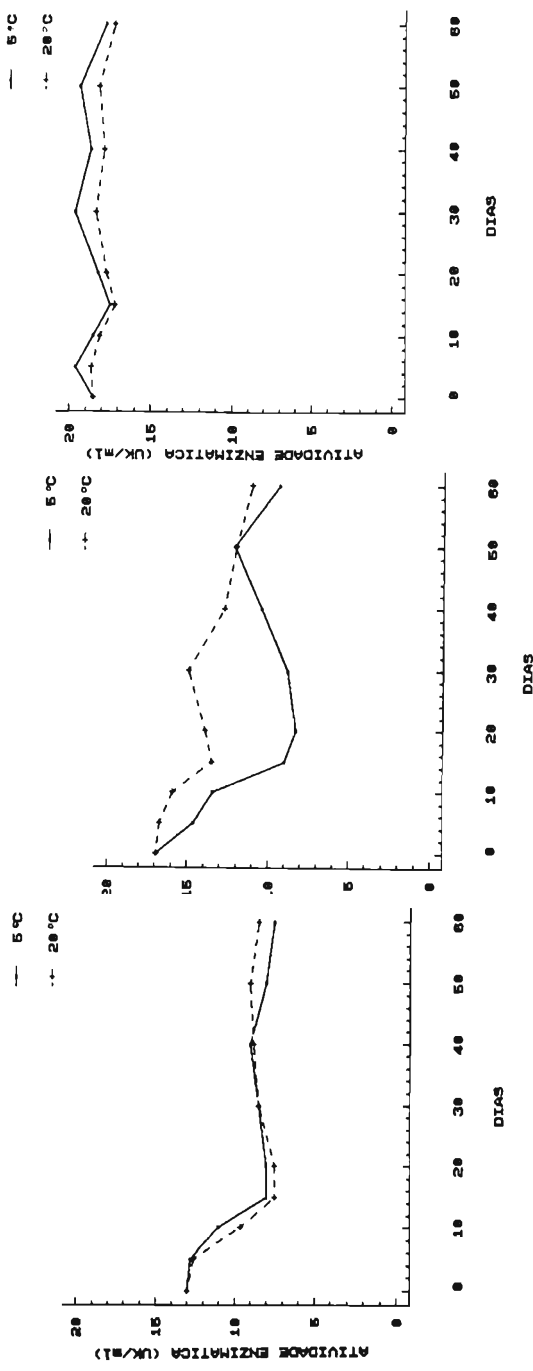


Figura 1. Atividade proteolítica em U.K./ml do extrato filtrado a 50°C sem ativadores - prova 1.

Figura 2. Atividade proteolítica em U.K./ml do extrato filtrado a 50°C com benzoato de sódio e cloridrato de cisteína - prova 2.

Figura 3. Atividade proteolítica em U.K./ml do extrato filtrado a 50°C com benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e edetato dissódico - prova 3.



A análise destes dados demonstra que o extrato sem ativadores (prova 1) sofre uma nítida perda de atividade proteolítica no decorrer do período, que se manifesta a partir do 15º dia de armazenamento a 5 e 20°C.

A amostra contendo benzoato de sódio e cloridrato de cisteína (prova 2) apresentou maior atividade proteolítica inicial, quando comparada com a amostra sem ativadores (prova 1). No entanto, também apresentou menor estabilidade após o 15º dia de armazenamento a 5 e 20°C.

A amostra contendo benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e edetato dissódico (Prova 3), permaneceu estável durante o período de avaliação, tendo inclusive apresentado uma atividade proteolítica superior em relação às provas 1 e 2.

O estudo comparativo destes dados permite supor que os agentes ativadores bloqueiam os inibidores da bromelina presentes no extrato. Este desbloqueio se reflete nos valores encontrados na prova 3, que além de se manterem praticamente inalterados após 60 dias, são superiores àqueles das provas 1 e 2.

A manutenção da atividade proteolítica do extrato submetido a teste de estabilidade também se reflete no aspecto da solução. A amostra sem ativadores (prova 1) sofreu escurecimento gradual com o tempo de armazenamento, enquanto que aquela com benzoato de sódio e cloridrato de

cisteína (prova 2) apresentou escurecimento menos intenso. Nesta prova, a amostra armazenada a 5°C apresentou um depósito esbranquiçado. A amostra com benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e edetato de sódio manteve-se praticamente inalterada em relação ao aspecto da solução.

Os valores de pH em todas as provas praticamente não se modificaram durante o período, indicando que este fator não contribuiu para a instabilidade da atividade proteolítica.

#### 6.2. Efeito do tratamento térmico e de ativadores sobre a purificação por filtração do extrato, na ativação e na estabilização da atividade proteolítica

Para se avaliar os reflexos do tratamento térmico sobre a purificação por filtração, foram efetuados ensaios de filtração de extratos a 20, 30, 40, 50 e 60°C, conforme ilustrado no fluxograma em 5.5.

As amostras filtradas a 20 e 30°C apresentaram-se opalescentes, com maior intensidade para a tratada a 20°C, enquanto que aquelas aquecidas a 40, 50 e 60°C mostraram-se límpidas após a filtração.

Em relação à duração de filtração, em idênticas condições, a amostra filtrada a 20°C consumiu tempo muito superior. A razão de filtração foi cerca de 1

litro por hora, com decréscimo gradual da quantidade filtrada, exigindo a renovação da camada de pré-filtro a cada litro filtrado. A amostra aquecida a 30°C foi filtrada em cerca de 2 horas, exigindo apenas uma renovação da camada de pré-filtro. As amostras aquecidas a 40, 50 e 60°C foram filtradas em aproximadamente 30 minutos, sem necessidade de renovação da camada de pré-filtro.

A tabela II relaciona os dados de estabilidade de amostras de extratos filtrados a 20, 30, 40, 50 e 60°C, designados por E-AI, E-BI, E-CI, E-DI e E-EI, sem ativadores, e por E-AII, E-BII, E-CII, E-DII e E-EII contendo benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e edetato dissódico, respectivamente. Estas amostras foram armazenadas em ambientes com temperaturas de 5, 20, 30 e 40°C, por um período de 90 dias.

As fig. 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 reproduzem graficamente os resultados da tabela II.

**Tabela II.** Atividades proteolíticas em U.K./ml de extratos armazenados a 5, 20, 30 e 40°C, após 0, 30, 60 e 90 dias. Provas das séries E-A, E-B, E-C, E-D e E-E, com aquecimento dos extratos a 20, 30, 40, 50 e 60°C, respectivamente. As partes I não contém ativadores e as II contém benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e edetato dissódico.

TEMPO DIAS	T.FIL- TRAÇÃO	ARMAZENAGEM				ARMAZENAGEM			
		5°C UK/ml	20°C UK/ml	30°C UK/ml	40°C UK/ml	5°C UK/ml	20°C UK/ml	30°C UK/ml	40°C UK/ml
	20°C	PROVA E-AI				PROVA E-AII			
0		17,2	17,2	17,2	17,2	18,4	18,4	18,4	18,4
30		12,2	12,8	11,8	10,6	19,4	20,4	20,8	9,0
60		10,8	11,4	11,7	8,3	21,2	18,8	17,2	4,4
90		9,4	9,0	4,0	2,0	21,3	18,7	7,3	2,0
	30°C	PROVA E-BI				PROVA E-BII			
0		17,8	17,8	17,8	17,8	18,6	18,6	18,6	18,6
30		17,3	17,6	12,4	9,5	21,0	18,4	17,0	8,8
60		16,6	16,0	7,0	6,0	19,8	18,3	16,5	6,4
90		13,9	15,4	3,4	2,0	18,6	18,0	9,6	2,0
	40°C	PROVA E-CI				PROVA E-CII			
0		18,2	18,2	18,2	18,2	19,2	19,2	19,2	19,2
30		14,5	17,8	12,1	8,4	23,3	21,8	16,8	10,8
60		15,4	16,4	7,0	6,4	21,0	19,7	12,2	6,9
90		12,8	13,6	5,2	2,0	19,7	17,5	7,5	2,0
	50°C	PROVA E-DI				PROVA E-DII			
0		21,4	21,4	21,4	21,4	22,2	22,2	22,2	22,2
30		19,1	19,1	12,8	8,8	21,8	20,1	15,0	12,0
60		18,6	18,4	9,4	6,1	20,9	21,5	10,4	7,4
90		14,1	15,2	4,8	2,0	17,2	16,9	6,8	2,0
	60°C	PROVA E-EI				PROVA E-EII			
0		9,2	9,2	9,2	9,2	10,9	10,9	10,9	10,9
30		6,4	6,4	6,4	6,4	12,5	11,2	7,6	5,2
60		6,4	4,9	4,0	4,7	14,6	10,2	6,6	3,3
90		5,8	2,0	2,0	2,0	8,4	6,3	4,7	2,0

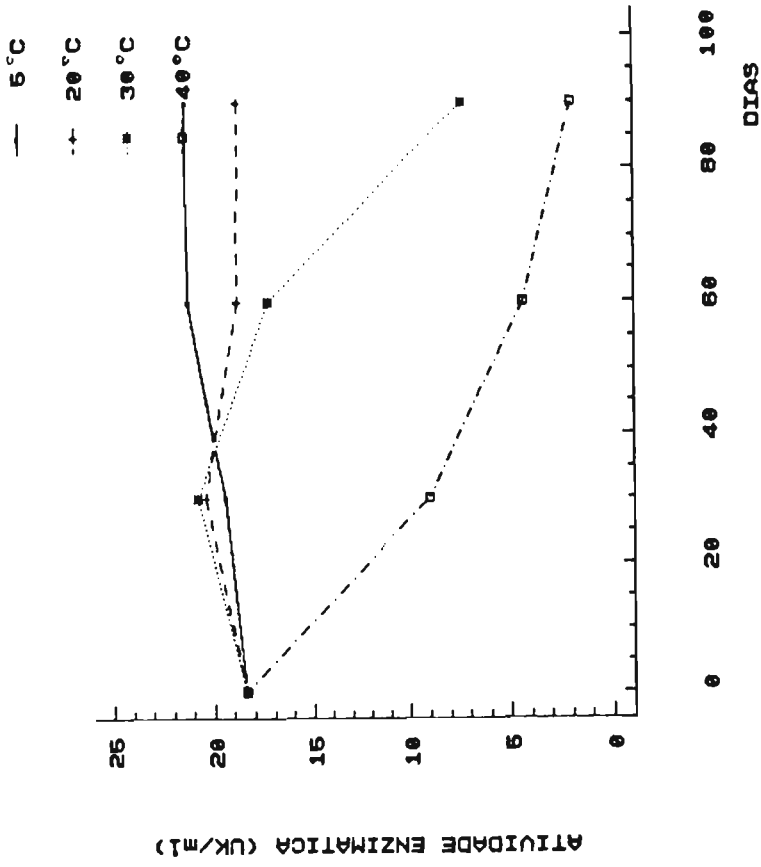


Figura 5. Atividade proteolítica em U.K./ml de extrato filtrado a 20°C contendo benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e edetato dissódico - amostra E-AII.

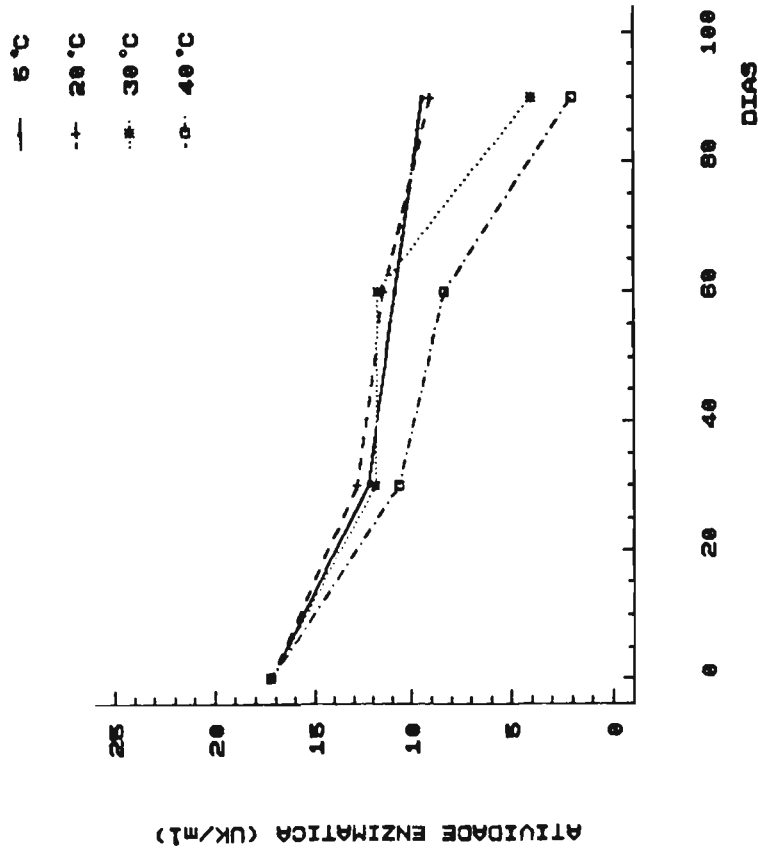


Figura 4. Atividade proteolítica em U.K./ml de extrato filtrado a 20°C sem ativadores - amostra E-AI.

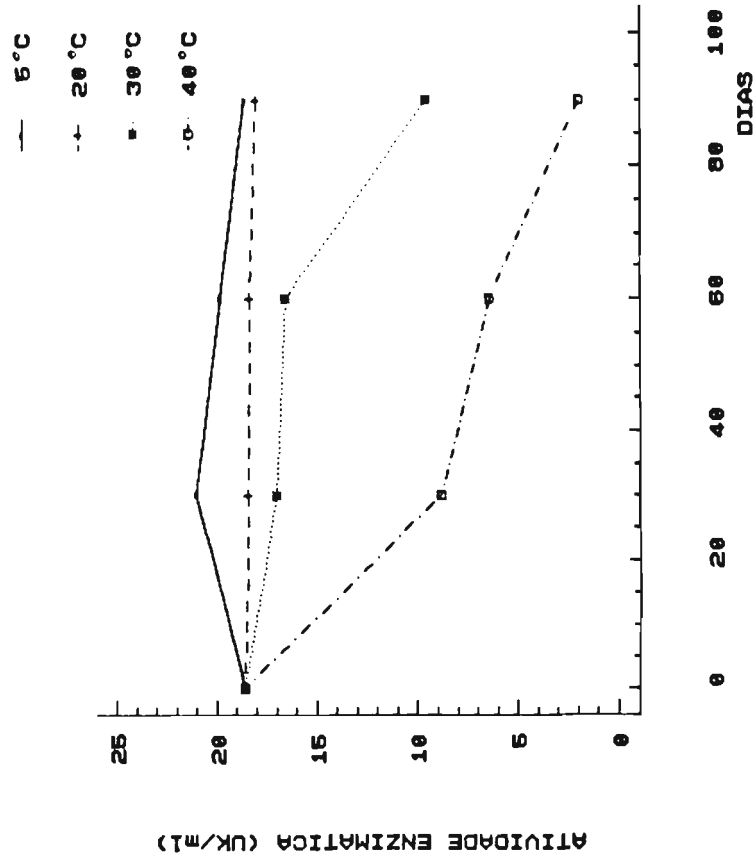


Figura 7. Atividade proteolítica em U.K./ml de extrato filtrado a 30°C contendo benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e edetato dissódico - amostra E-BII.

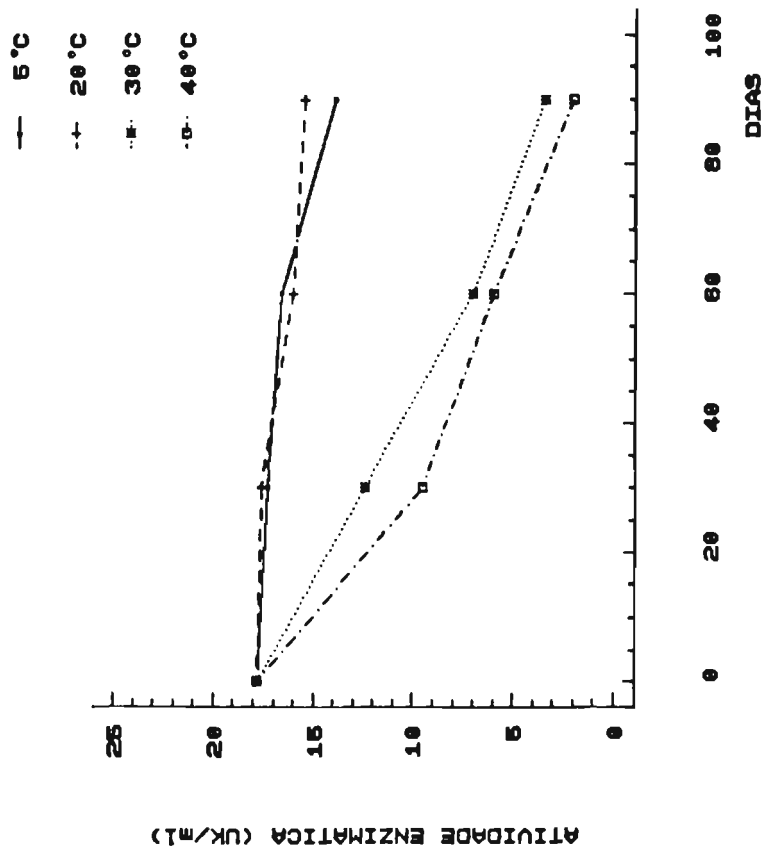


Figura 6. Atividade proteolítica em U.K./ml de extrato filtrado a 30°C sem ativadores - amostra E-BI.

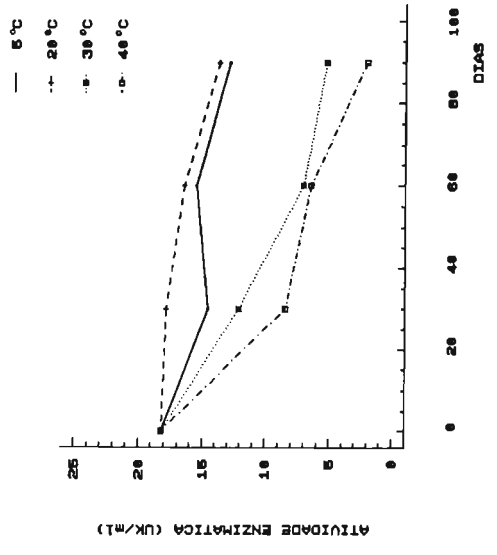
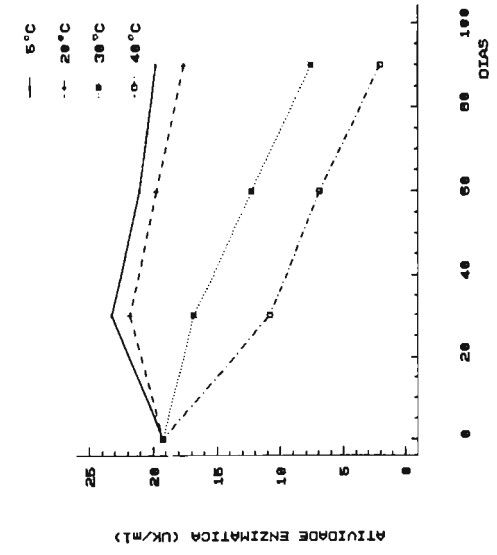


Figura 8. Atividade proteolítica em U.K./ml de extrato filtrado a 40°C sem ativadores - amostra E-CI.

Figura 9. Atividade proteolítica em U.K./ml de extrato filtrado a 40°C contendo benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e edetato dissódico - amostra E-CII.

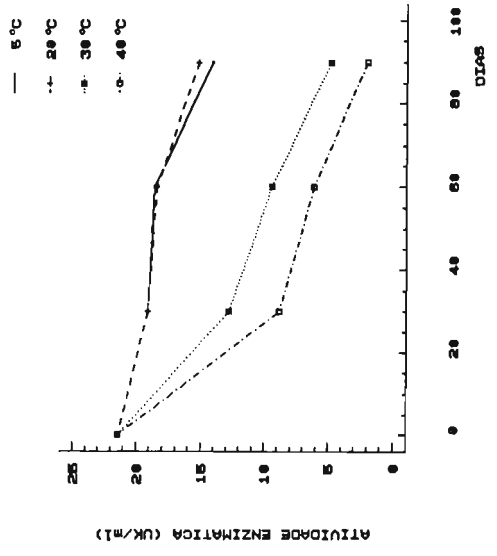
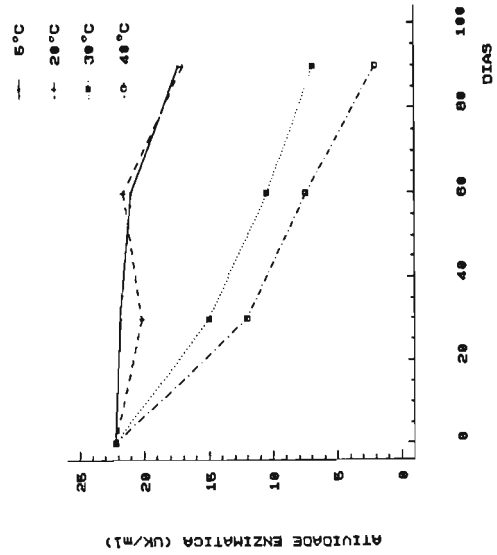


Figura 10. Atividade proteolítica em U.K./ml de extrato filtrado a 50°C sem ativadores - amostra E-DI.

Figura 11. Atividade proteolítica em U.K./ml de extrato filtrado a 50°C contendo benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e edetato dissódico - amostra E-DII.



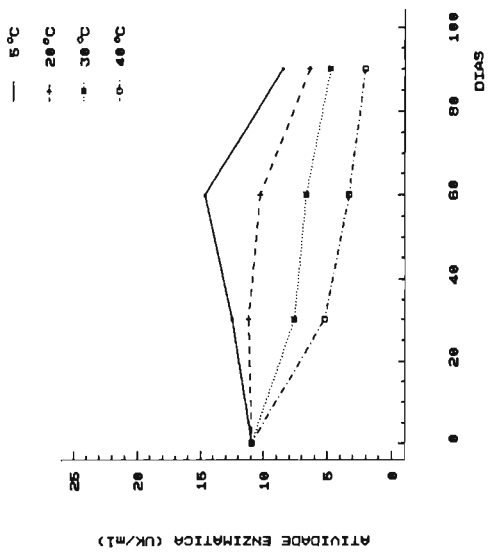


Figura 13. Atividade proteolítica em U.K./ml de extrato filtrado a 60°C contendo benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e edetato dissódico - amostra E-III.

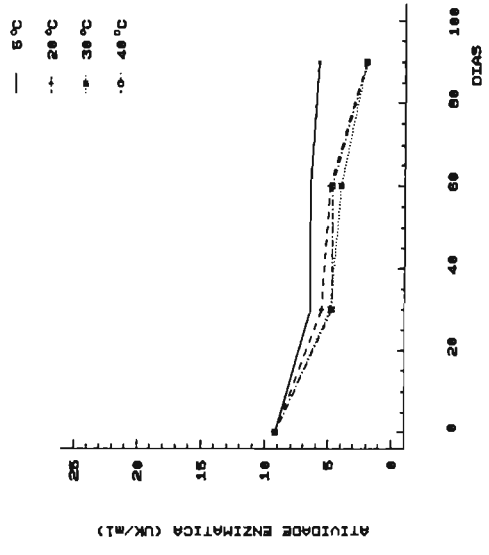


Figura 12. Atividade proteolítica em U.K./ml de extrato filtrado a 60°C sem ativadores - amostra E-II.

Os resultados obtidos revelam que extratos filtrados, sem ativadores, apresentam menor atividade proteolítica que os correspondentes ativados, para cada temperatura, segundo a tabela II.

A análise da tabela II revela que a atividade proteolítica dos extratos também aumenta gradualmente de 20 a 50°C, sofrendo uma sensível redução a 60°C.

Os estudos de estabilidade realizados nas amostras iniciais e após 30, 60 e 90 dias, armazenados nas temperaturas de 5, 20, 30 e 40°C, revelam que as amostras sem ativadores (E-AI, E-BI, E-CI, E-DI e E-EI) apresentam menor estabilidade quando comparadas com as ativadas (E-AII, E-BII, E-CII, E-DII e E-EII), conforme se visualiza nas Fig. 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13.

Pode-se também verificar que as amostras mantidas a 5 e 20°C apresentaram maior estabilidade que aquelas a 30 e 40°C.

As amostras armazenadas a 40°C demonstraram redução da ordem de 50% da atividade proteolítica após 30 dias de armazenamento.

Em função dos resultados comparativos das amostras armazenadas a 5 e 20°C, constata-se que o extrato E-DII apresentou valores mais elevados em unidades Kunitz e melhor estabilidade após 60 dias.

O tratamento térmico do extrato a 60°C promove uma perda irreversível da atividade da amostra sem ativadores (E-EI), com decaimento gradual até 90 dias, conforme mostra a Fig. 12. No entanto, o extrato filtrado contendo ativadores (E-EII) apresenta uma discreta recuperação da atividade proteolítica após 30 e 60 dias na amostra armazenada a 5°C, segundo a Fig. 13.

### 6.3. Efeito do tratamento térmico no extrato e de ativadores sobre o rendimento de bromelina e no balanço material

Com a finalidade de se avaliar o efeito do tratamento térmico e de ativadores aplicado a amostras de extratos filtrados a 20, 30, 40, 50 e 60°C sobre o rendimento de bromelina precipitada por acetona e por sulfato de amônio, foram realizadas provas de preparação de enzima em pó, conforme ilustrado no fluxograma 5.5.

As provas foram divididas em 5 séries, denominadas A, B, C, D e E, que respectivamente foram aquecidas a 20, 30, 40, 50 e 60°C. As partes I e II não continham ativadores e foram precipitados por acetona e sulfato de amônio; as partes III e IV continham benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e edetato dissódico, foram precipitadas por acetona e sulfato de amônio.

As amostras de bromelina em pó foram identificadas através de eletroforese de gel de poliacrilamida, utilizando-se bromelina SIGMA como padrão de referência. O perfil eletroforético básico das amostras foi idêntico ao do padrão, apresentando ainda outras frações protéicas, normalmente presentes em bromelinas denominadas brutas.

Os resultados obtidos, que relacionam as atividades iniciais e totais dos extratos, o rendimento em gramas e as correspondentes atividades, bem como as atividades totais calculadas, encontram-se na tabela III.

A Fig. 14 reproduz graficamente os resultados da tabela III relativos às quantidades totais de unidades existentes nos extratos sem e com ativadores.

Na Fig. 15 relacionam-se os resultados das atividades totais obtidas, calculadas a partir dos rendimentos e das respectivas atividades de cada prova.

Tabela III. Balanço material das provas A, B, C, D e E e suas respectivas partes I, II, III e IV.

Provas das séries A, B, C, D e E, com tratamento térmico dos extratos a 20, 30, 40, 50 e 60°C, respectivamente. Partes I e II sem ativadores, precipitadas por acetona e por sulfato de amônio; partes III e IV com benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e edetato dissódico, precipitadas por acetona e sulfato de amônio.

PROVA NUMERO	ATIVI- DADE UK/ml	ATIVIDADE 1000 ml UK	RENDI- MENTO g	ATIVI- DADE UK/g	ATIVIDADE TOTAL UK	RECUPE- RAÇÃO %
A-I	17,2	17200,0	26,1	411,6	10742,8	62,5
A-II	17,2	17200,0	31,3	492,0	15399,6	89,5
A-III	18,4	18400,0	26,0	513,2	13343,2	72,5
A-IV	18,4	18400,0	31,7	582,0	18449,4	100,3
B-I	17,8	17800,0	26,6	487,6	12970,2	72,9
B-II	17,8	17800,0	32,1	522,0	16756,2	94,1
B-III	18,6	18600,0	27,4	556,8	15256,3	82,0
B-IV	18,6	18600,0	32,8	634,8	20821,4	111,9
C-I	18,2	18200,0	27,6	490,4	13535,0	74,4
C-II	18,2	18200,0	32,2	557,0	17935,4	98,5
C-III	19,2	19200,0	26,6	616,0	16385,6	85,3
C-IV	19,2	19200,0	32,4	740,4	23989,0	124,9
D-I	21,4	21400,0	23,5	525,6	12351,6	57,7
D-II	21,4	21400,0	20,0	644,4	12888,0	60,2
D-III	22,2	22200,0	23,0	693,6	15952,8	71,9
D-IV	22,2	22200,0	28,5	714,0	20349,0	91,7
E-I	9,2	9200,0	23,0	400,0	9200,0	100,0
E-II	9,2	9200,0	19,0	466,0	8854,0	96,2
E-III	10,8	10800,0	26,2	444,0	11632,8	107,7
E-IV	10,8	10800,0	19,5	523,0	10202,4	94,5

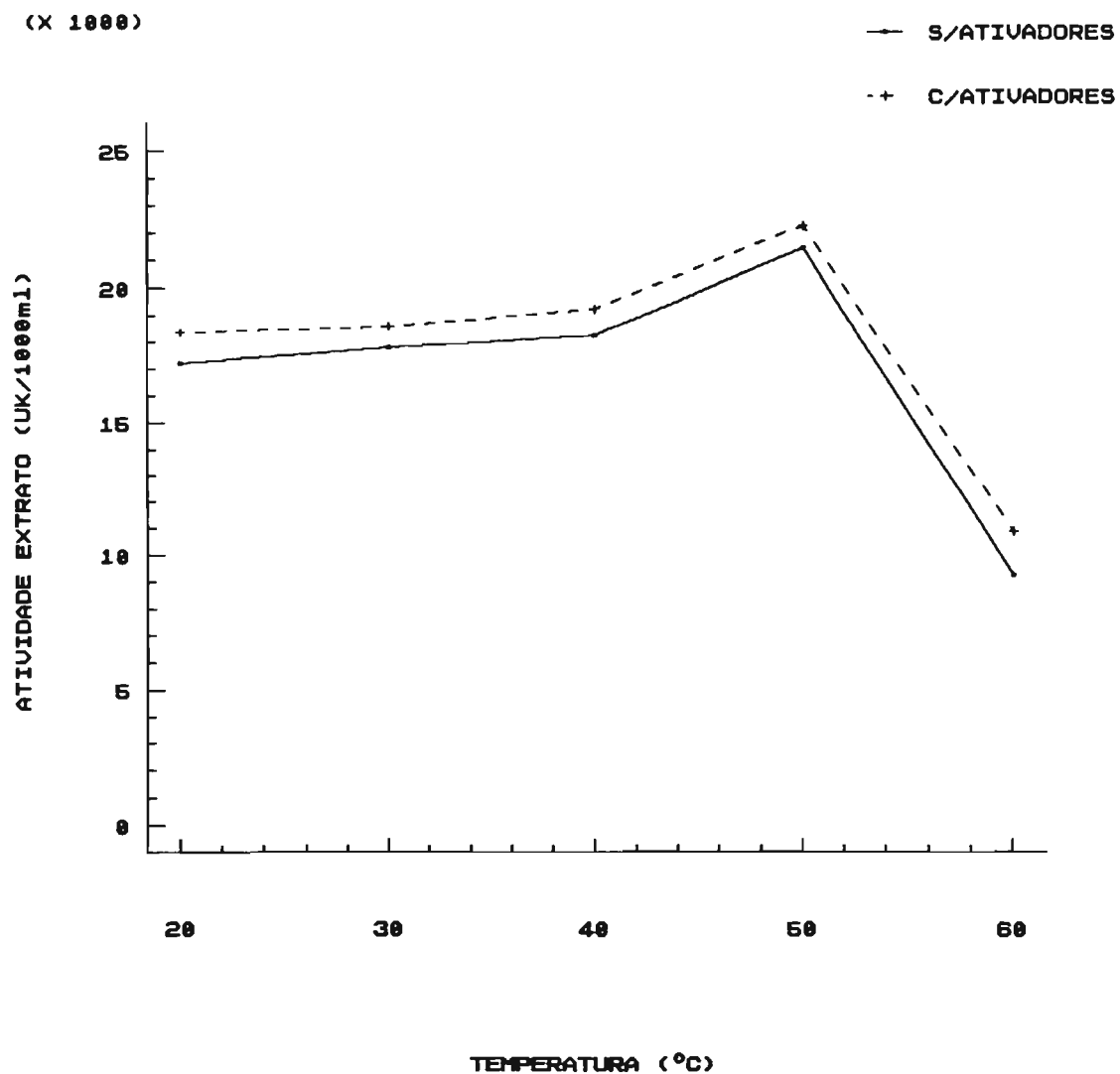


Figura 14. Atividades totais em U.K. de 1000 ml de extratos sem e com benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e edetato dissódico em função das temperaturas de aquecimento 20, 30, 40, 50 e 60°C correspondente às séries A, B, C, D e E, respectivamente.

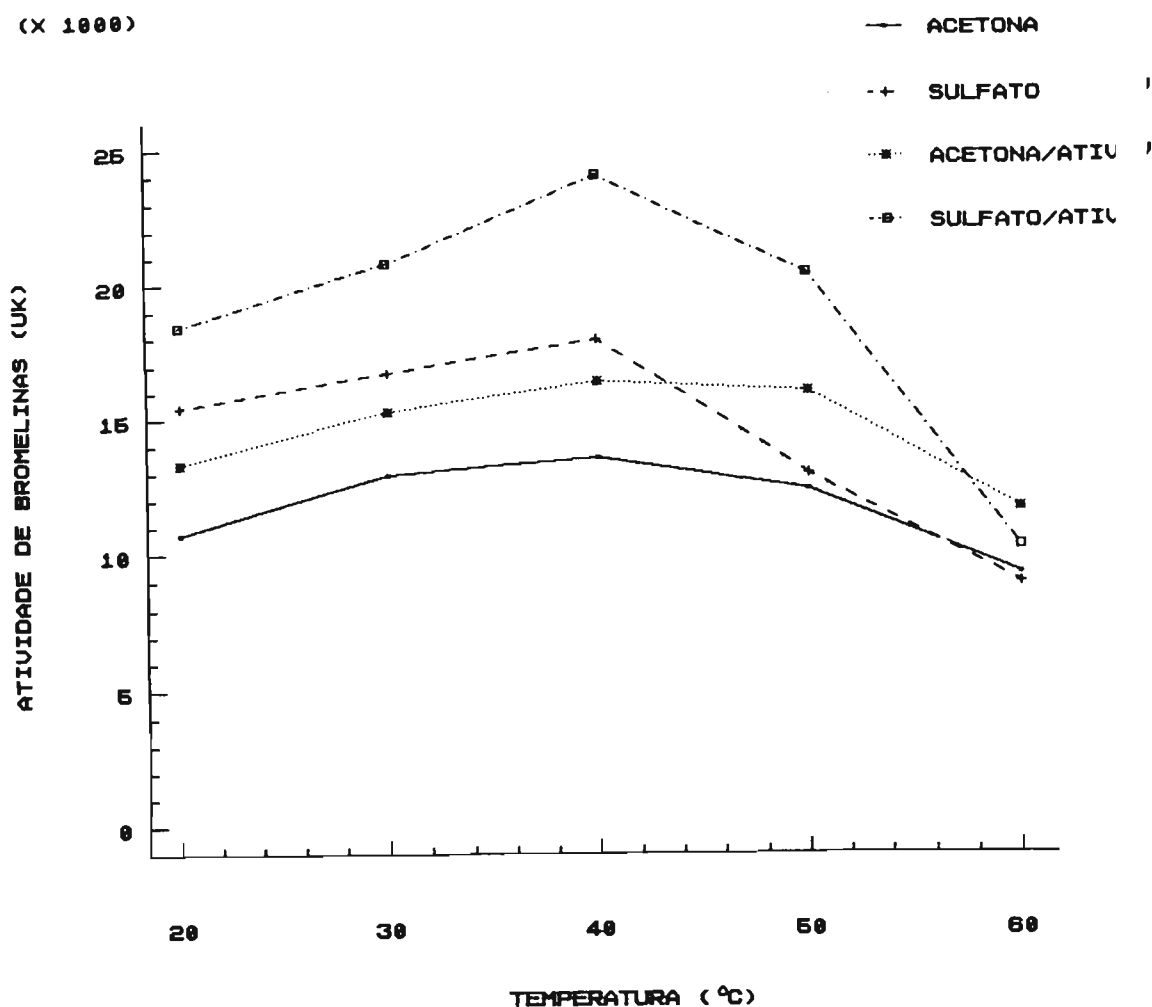


Figura 15. Atividades totais em U.K. calculadas em relação aos rendimentos das provas A, B, C, D e E e suas respectivas partes I, II, III e IV, de extratos: sem ativadores precipitados por acetona (A-I, B-I, C-I, D-I e E-I) e por sulfato de amônio (A-II, B-II, C-II, D-II e E-II) com benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e edetato dissódico precipitados por acetona (A-III, B-III, C-III, D-III e E-III) e por sulfato de amônio (A-IV, B-IV, C-IV, D-IV e E-IV).

Através dos dados da tabela III constata-se que as atividades dos extratos cresceram à medida que foram aumentadas as temperaturas de filtração até 50°C, tanto sem quanto com ativadores (séries A, B, C e D), diminuindo abruptamente para os extratos filtrados a 60°C (série E). As quantidades totais de unidades presentes nos extratos submetidos a processos de precipitação estão reproduzidos na Fig. 14, mostrando nitidamente o efeito da temperatura e dos ativadores sobre a atividade proteolítica.

Os resultados dos processos de precipitação indicam que as quantidades em gramas de bromelina obtidas são praticamente idênticas quando se utilizou acetona (A-I, A-III, B-I, B-III, C-I e C-III), muito embora se tenha constatado crescente aumento da atividade proteolítica recuperada, à medida que se elevou a temperatura de filtração do extrato. Fenômeno semelhante se constata quando foi utilizado sulfato de amônio (A-II, A-IV, B-II, B-IV, C-II e C-IV).

As massas de enzima obtidas de extratos filtrados a 50 e 60°C são inferiores às demais, tanto para a acetona (D-I, D-III, E-I e E-III), quanto para sulfato de amônio (D-II, D-IV, E-II e E-IV). Em correspondência com as quantidades, o total de unidades recuperadas também foi inferior, diminuindo ainda mais para as amostras de extratos filtrados a 60°C.



A análise comparativa das unidades totais recuperadas revela que o maior índice se obteve quando se utilizou sulfato de amônio como agente precipitante sobre extrato filtrado a 40°C (bromelina C-IV), contendo ativadores. O aparente paradoxo constatado neste balanço material, expresso em unidades de atividade proteolítica, poderia ser interpretado como sendo decorrente de decomposição ou de insolubilização dos inibidores presentes no extrato. Desta maneira, a bromelina livre de bloqueantes apresenta maior atividade específica, justificando um balanço material superavitário.

Através da Fig. 15 verifica-se que o balanço material mostrou-se, em todos os casos, mais favorável quando se utilizou temperatura de 40°C para filtração do extrato. Nesta temperatura, o sulfato de amônio é mais eficiente que a acetona, tanto com extratos sem ativadores quanto naqueles contendo benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e edetato dissódico.

O incremento no balanço material, promovido pelo uso da acetona no extrato contendo ativadores, em comparação com aquele sem essas substâncias foi de 10,9%, muito embora a recuperação não tenha sido superior a 85,3% das unidades existentes no material de partida.

Ainda pela Fig. 15 constata-se que o balanço material promovido pelo emprego do sulfato de amônio em extrato contendo ativadores é nitidamente superior áqueles

obtidos no extrato sem aditivos, superando em 26,4%. Verifica-se inclusive que a quantidade recuperada foi superior à existente, provavelmente resultante da ação conjunta do tratamento térmico, ativadores e agente precipitante.

#### 6.4. Efeito do tratamento térmico e de ativadores sobre a estabilidade da bromelina precipitada por acetona e por sulfato de amônio

Para avaliar a influência do tratamento térmico aplicado aos extratos em conjunto com o uso de ativadores (benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e edetato dissódico) sobre a atividade da bromelina em pó precipitada por acetona e por sulfato de amônio, foram realizados estudos de estabilidade.

As amostras de bromelina correspondentes às partes I, II, III e IV das séries A, B, C, D e E foram acondicionadas em frascos de vidro e fechados com tampas de plástico e armazenadas a temperaturas de 5, 20, 30 e 40°C.

As análises, para determinação da atividade proteolítica, foram realizadas logo após a obtenção das amostras e após 30, 60 e 90 dias.

Os resultados das análises, expressos em unidades Kunitz por grama de bromelina em pó, estão contidos na tabela IV.

As Fig. 16 e 17 relacionam as atividades em U.K./g das amostras de bromelina precipitadas por acetona a partir de extratos filtrados a 20, 30, 40, 50 e 60°C sem ativadores (A-I, B-I, C-I, D-I e E-I), após 0 e 90 dias, armazenadas a 5 e 20°C, respectivamente.

As Fig. 18 e 19 reproduzem graficamente as atividades em U.K./g das amostras precipitadas por sulfato de amônio a partir de extratos filtrados a 20, 30, 40, 50 e 60°C sem ativadores (A-II, B-II, C-II, D-II e E-II), após 0 e 90 dias, armazenadas a 5 e 20°C, respectivamente.

As Fig. 20 e 21 mostram as atividades em U.K./g das amostras precipitadas por acetona a partir de extratos filtrados a 20, 30, 40, 50 e 60°C com ativadores (A-III, B-III, C-III, D-III e E-III), após 0 e 90 dias, armazenados a 5 e 20°C, respectivamente.

As Fig. 22 e 23 relacionam as atividades em U.K./g das amostras precipitadas por sulfato de amônio a partir de extratos filtrados a 20, 30, 40, 50 e 60°C com ativadores (A-IV, B-IV, C-IV, D-IV e E-IV), após 0 e 90 dias, armazenados a 5 e 20°C, respectivamente.

Tabela IV. Atividades em U.K./g de bromelina armazenadas a 5, 20, 30 e 40°C, após 30, 60 e 90 dias. Provas das séries E-A, E-B, E-C, E-D e E-E, com aquecimento dos extratos a 20, 30, 40, 50 e 60°C, respectivamente. As partes I e II não contém ativadores, precipitadas por acetona e sulfato de amônio; partes III e IV com benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e edetato dissódico, precipitadas por acetona e sulfato de amônio.

PROVA	DIAS	TEMPERATURAS				PROVA	DIAS	TEMPERATURAS			
		5°C	20°C	30°C	40°C			5°C	20°C	30°C	40°C
		UNIDADES KUNITZ / g						UNIDADES KUNITZ / g			
A-I	0	411,6	411,6	411,6	411,6	A-III	0	513,2	513,2	513,2	513,2
	30	414,0	408,8	416,8	411,6		30	481,2	483,6	440,4	450,0
	60	405,6	412,4	418,0	387,2		60	525,0	534,0	508,2	475,8
	90	406,0	379,2	346,0	270,0		90	536,8	516,0	400,8	260,4
A-II	0	492,0	492,0	492,0	492,0	A-IV	0	582,0	582,0	582,0	582,0
	30	520,0	488,4	468,0	448,8		30	580,8	508,8	472,8	241,2
	60	498,4	472,8	394,8	221,6		60	543,6	405,6	394,8	171,4
	90	493,6	422,4	352,8	214,8		90	495,6	260,4	208,8	120,0
B-I	0	487,6	487,6	487,6	487,6	B-III	0	556,8	556,8	556,8	556,8
	30	517,2	519,6	484,8	444,0		30	604,8	519,6	324,0	205,2
	60	444,0	448,8	297,6	259,2		60	595,0	453,6	279,6	120,0
	90	411,6	402,2	295,2	206,4		90	559,2	343,2	228,0	80,0
B-II	0	522,0	522,0	522,0	522,0	B-IV	0	634,8	634,8	634,8	634,8
	30	450,0	483,2	343,2	268,8		30	589,6	558,4	412,4	363,2
	60	361,2	308,4	268,8	142,8		60	489,6	455,6	398,0	181,6
	90	324,0	300,0	207,6	120,0		90	469,2	246,0	181,2	120,0
C-I	0	490,4	490,4	490,4	490,4	C-III	0	616,0	616,0	616,0	616,0
	30	507,6	428,4	404,4	272,4		30	633,6	598,8	576,4	492,8
	60	521,2	432,8	417,2	278,0		60	608,8	576,4	566,4	436,8
	90	520,8	442,8	409,2	244,8		90	568,8	477,6	399,6	326,4
C-II	0	557,0	557,0	557,0	557,0	C-IV	0	740,4	740,4	740,4	740,4
	30	490,8	393,6	357,6	169,2		30	739,6	714,8	663,2	402,0
	60	453,6	386,4	321,6	144,8		60	701,6	646,8	404,0	330,8
	90	424,8	375,6	295,2	120,0		90	631,6	498,0	320,0	120,0
D-I	0	525,6	525,6	525,6	525,6	D-III	0	693,6	693,6	693,6	693,6
	30	518,4	486,0	384,0	336,0		30	592,8	580,0	571,6	514,0
	60	370,8	344,4	312,0	174,8		60	524,8	516,0	469,2	396,0
	90	314,4	312,0	289,2	160,8		90	493,6	474,0	388,8	234,0
D-II	0	644,4	644,4	644,4	644,4	D-IV	0	714,0	714,0	714,0	714,0
	30	573,6	538,8	493,2	468,8		30	635,6	633,0	578,6	524,4
	60	506,4	474,0	378,0	282,4		60	560,8	461,2	454,4	328,4
	90	220,2	177,0	161,4	123,6		90	506,8	439,2	346,0	230,0
E-I	0	400,0	400,0	400,0	400,0	E-III	0	444,0	444,0	444,0	444,0
	30	421,8	354,2	235,2	206,8		30	443,7	428,6	265,0	189,2
	60	267,6	207,6	162,0	153,6		60	336,0	198,0	124,8	120,0
	90	207,6	186,0	139,2	100,0		90	244,8	170,4	120,0	100,0
E-II	0	466,0	466,0	466,0	466,0	E-IV	0	522,0	522,0	522,0	522,0
	30	461,8	440,6	457,0	323,2		30	518,4	471,6	466,4	335,2

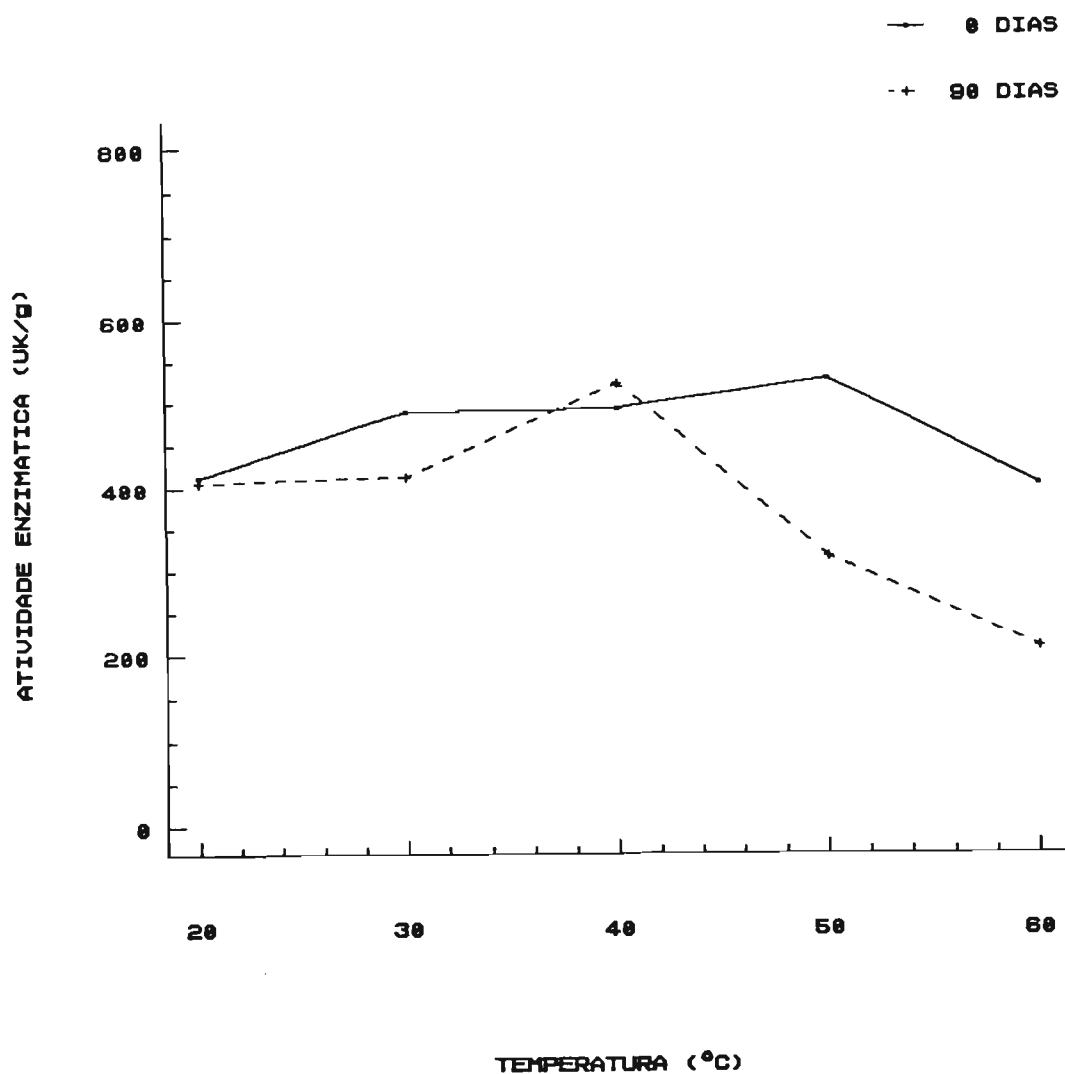


Figura 16. Atividades em U.K./g de bromelina (A-I, B-I, C-I, D-I e E-I) obtidas de extratos filtrados a 20, 30, 40, 50 e 60°C, sem ativadores, precipitadas por acetona, após 0 e 90 dias de armazenamento a 5°C.

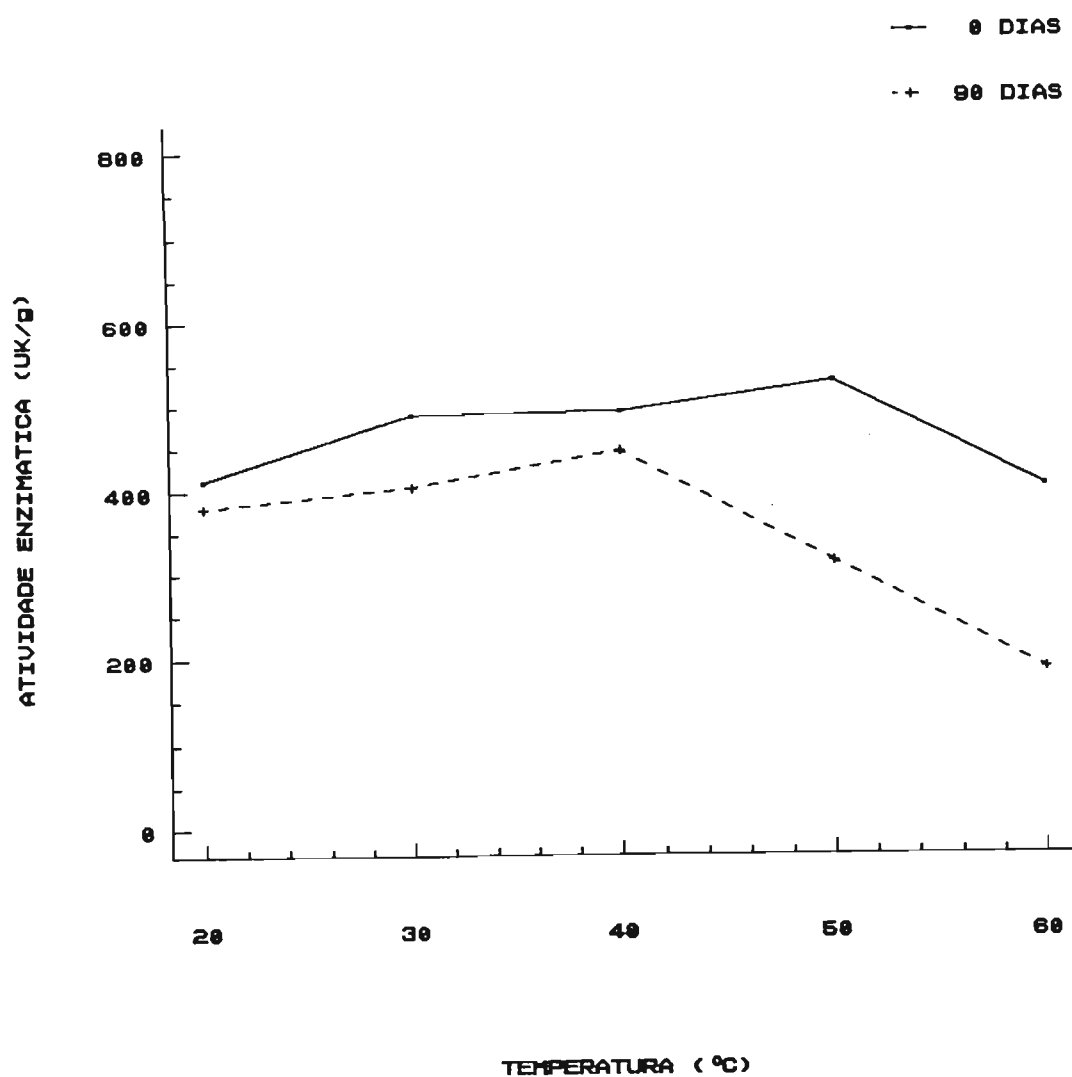


Figura 17. Atividades em U.K./g de bromelina (A-I, B-I, C-I, D-I e E-I) obtidas de extratos filtrados a 20, 30, 40, 50 e 60°C, sem ativadores, precipitadas por acetona, após 0 e 90 dias de armazenamento a 20°C.

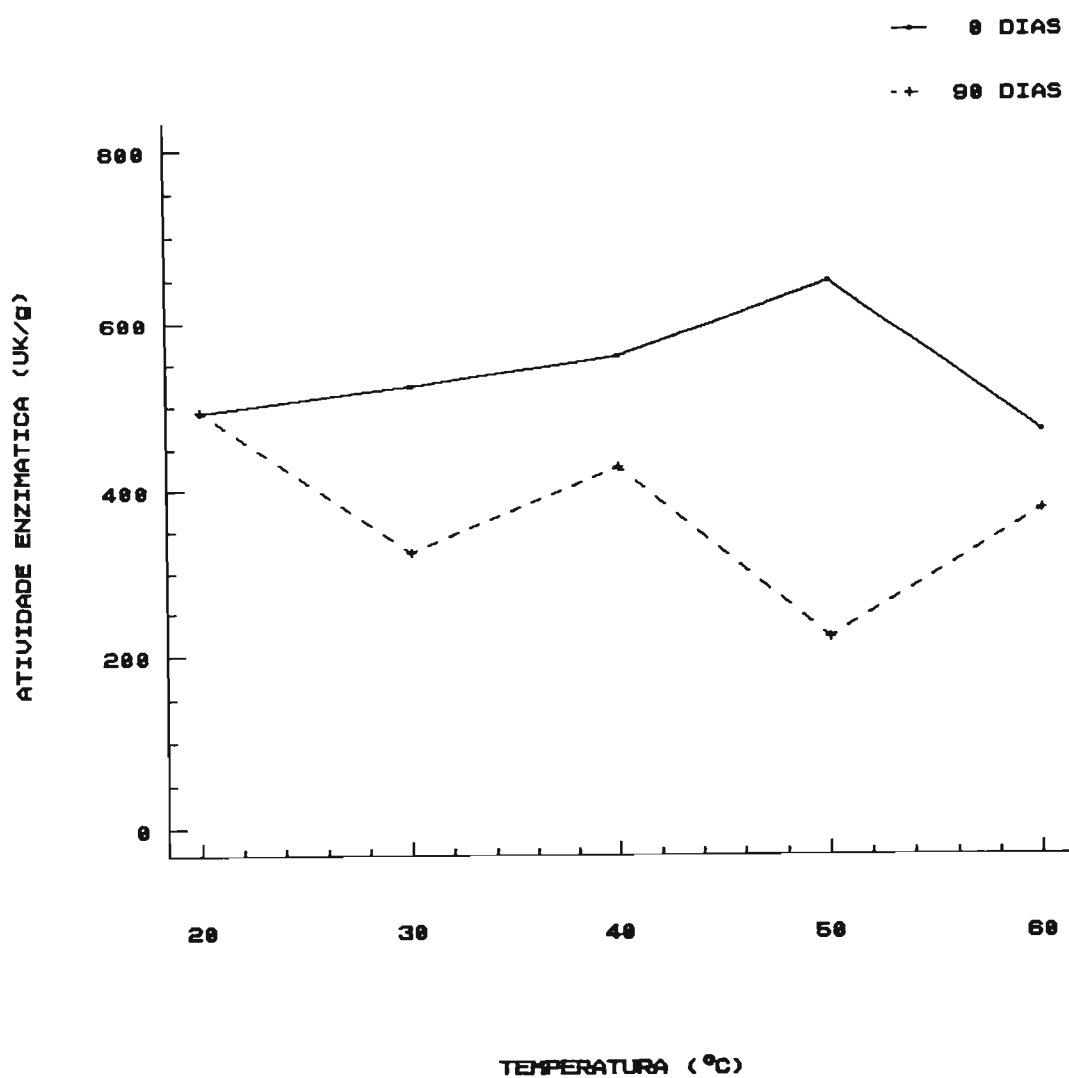


Figura 18. Atividades em U.K./g de bromelina (A-II, B-II, C-II, D-II e E-II) obtidas de extratos filtrados a 20, 30, 40, 50 e 60°C, sem ativadores, precipitadas por sulfato de amônio, após 0 e 90 dias de armazenamento a 5°C.

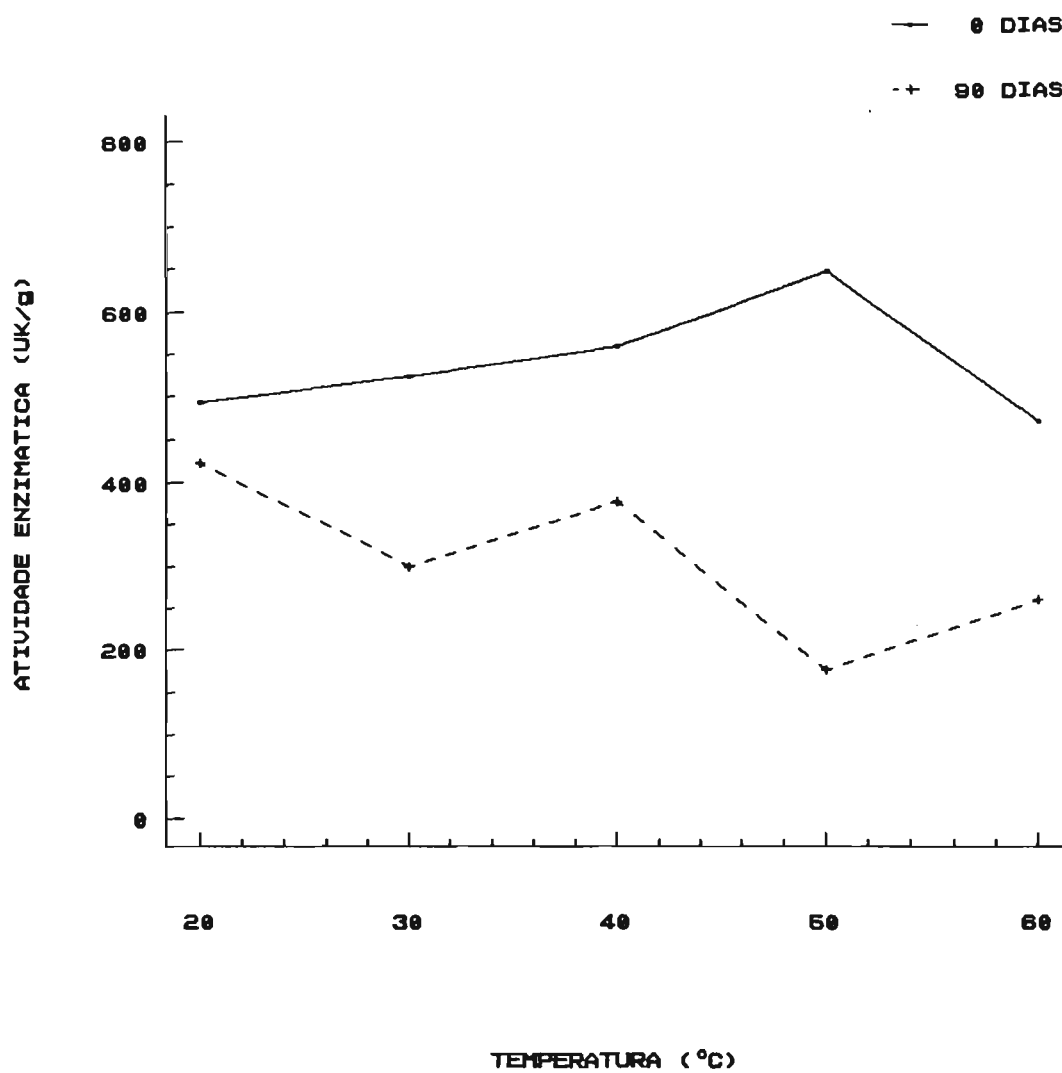


Figura 19. Atividades em U.K./g de bromelina (A-II, B-II, C-II, D-II e E-II) obtidas de extratos filtrados a 20, 30, 40, 50 e 60°C, sem ativadores, precipitadas por acetona, após 0 e 90 dias de armazenamento a 20°C.



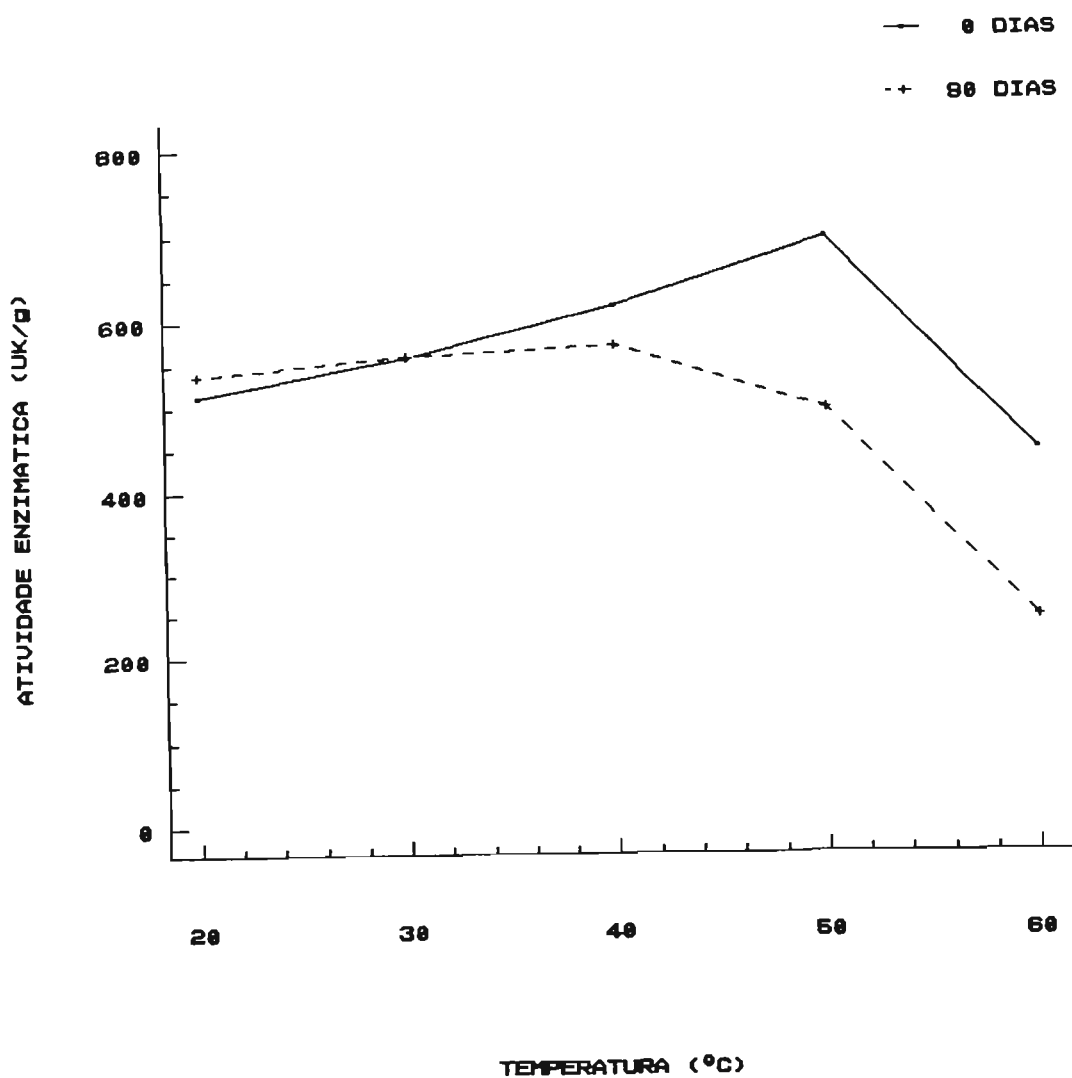


Figura 20. Atividades em U.K./g de bromelina (A-III, B-III, C-III, D-III e E-III) obtidas de extratos filtrados a 20, 30, 40, 50 e 60°C, com benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e edetato dissódico, precipitadas por acetona, após 0 e 90 dias de armazenamento a 5°C.

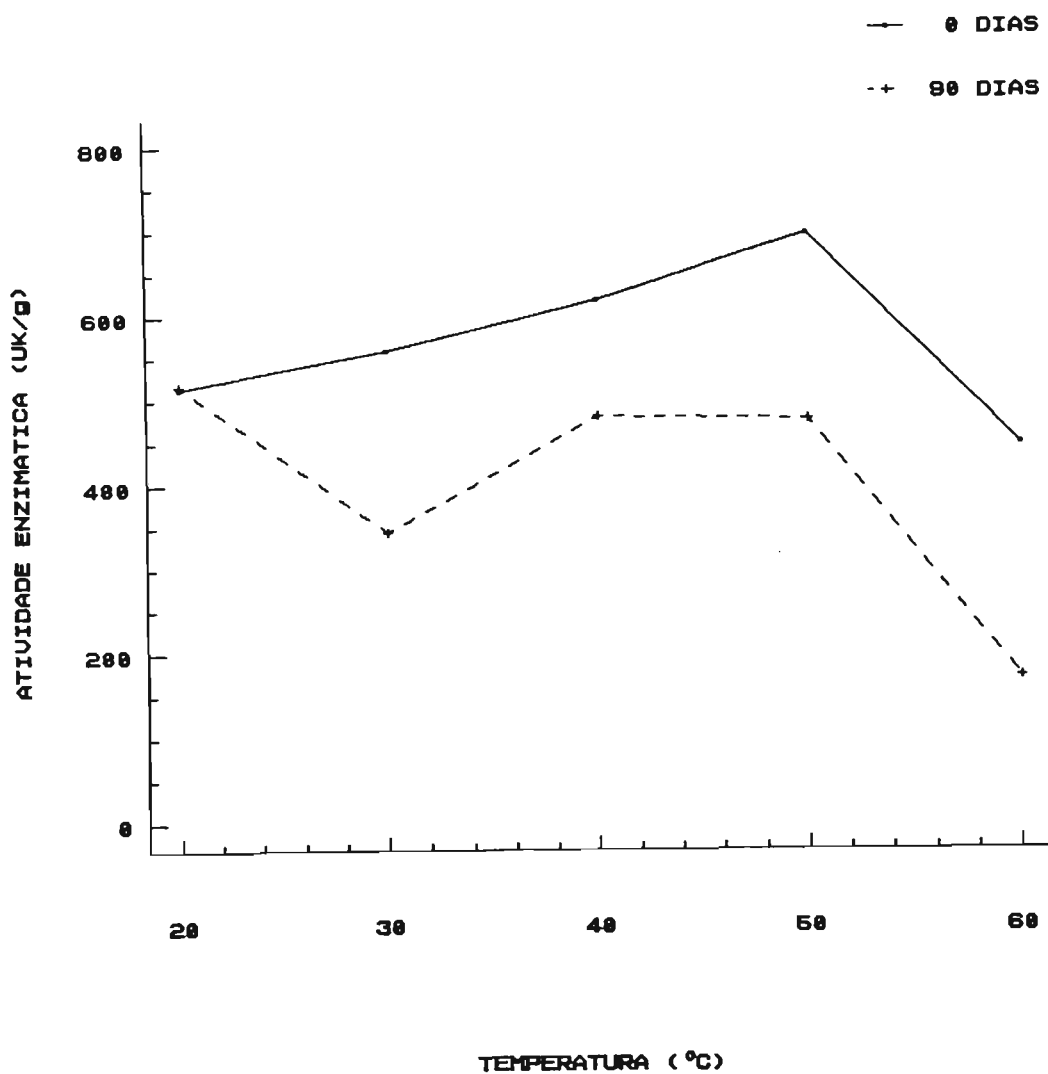


Figura 21. Atividades em U.K./g de bromelina (A-III, B-III, C-III, D-III e E-III) obtidas de extratos filtrados a 20, 30, 40, 50 e 60°C, com benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e edetato dissódico, precipitadas por acetona, após 0 e 90 dias de armazenamento a 20°C.

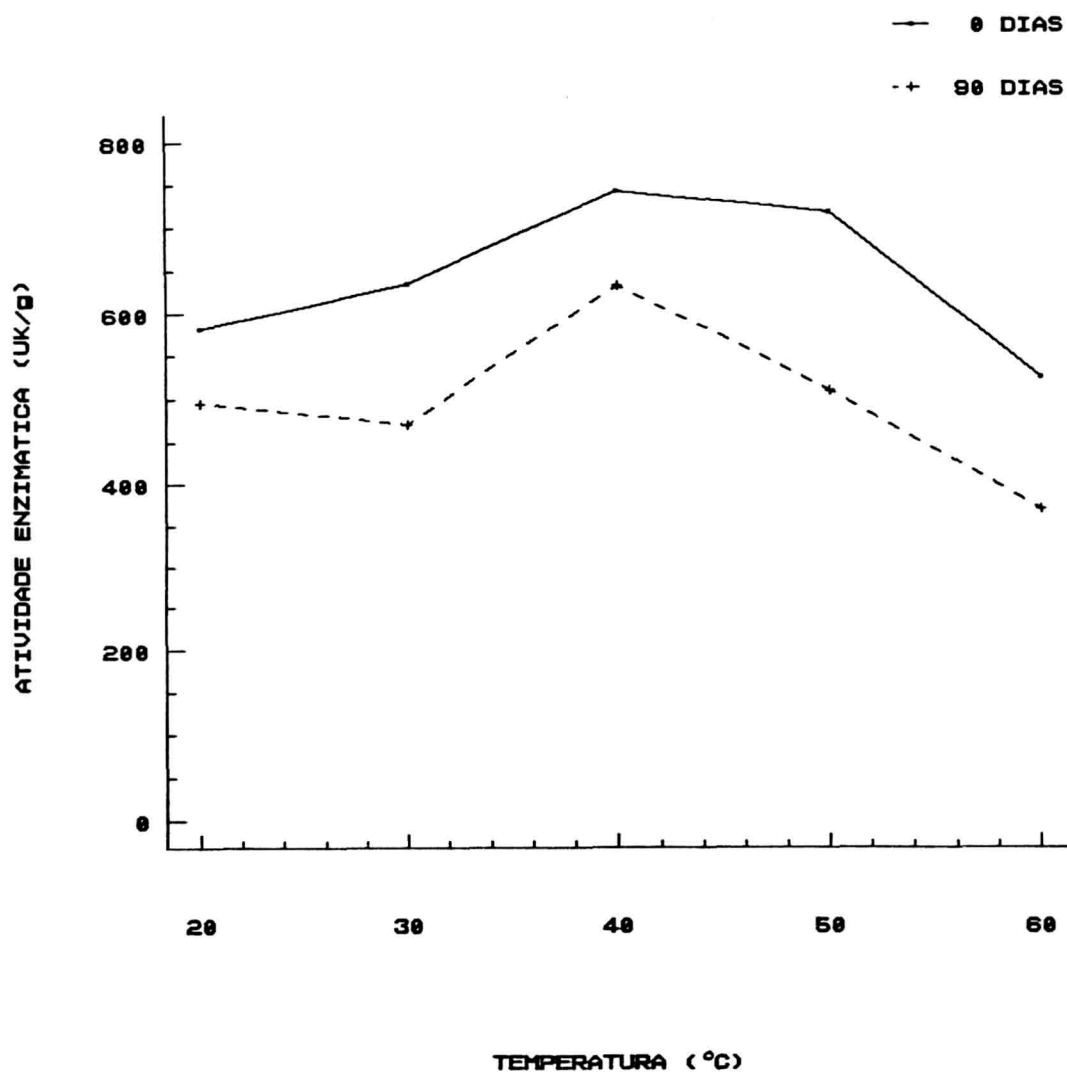


Figura 22. Atividades em U.K./g de bromelina (A-IV, B-IV, C-IV, D-IV e E-IV) obtidas de extratos filtrados a 20, 30, 40, 50 e 60°C, com benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e edetato dissódico, precipitadas por sulfato de amônio, após 0 e 90 dias de armazenamento a 5°C.

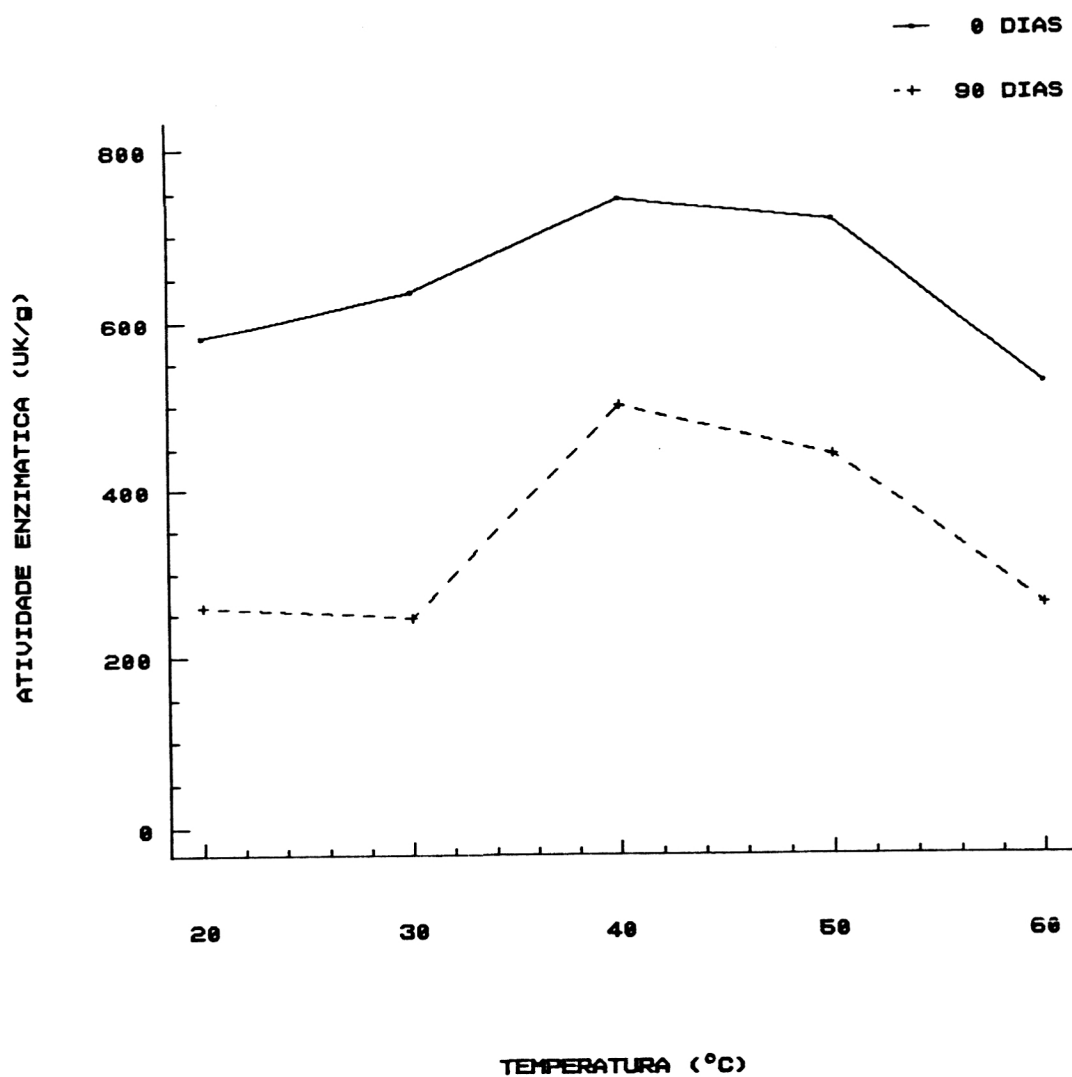


Figura 23. Atividades em U.K./g de bromelina (A-IV, B-IV, C-IV, D-IV e E-IV) obtidas de extratos filtrados a 20, 30, 40, 50 e 60°C, com benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e edetato dissódico, precipitadas por sulfato de amônio, após 0 e 90 dias de armazenamento a 20°C.

Os resultados do estudo de estabilidade demonstram que a bromelina (amostras A-I e A-III), obtida por precipitação com acetona, a partir de extratos filtrados a 20°C, apresentou melhor estabilidade que as demais, em todas as temperaturas de armazenagem. Para as referidas amostras, a incorporação de benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e edetato dissódico no extrato aumentou a atividade proteolítica do produto final e a manteve praticamente inalterada após 90 dias nas temperaturas de armazenamento de 5 e 20°C. As amostras submetidas a estabilidade a 30 e 40°C apresentaram redução da atividade após 90 dias, porém em proporções inferiores às constatadas nas demais provas, conforme ilustrado na tabela IV.

Pelos dados constantes da tabela IV constata-se que as amostras armazenadas a 5°C apresentaram maior estabilidade que aquelas mantidas a 20°C, após 90 dias de estudo. Em idêntico período de estabilidade, as amostras armazenadas a 30 e 40°C sofreram maior perda de atividade, acentuando-se naquelas a 40°C.

De um modo geral os ativadores, adicionados aos extratos antes do processo de precipitação da bromelina, não contribuíram para a estabilização das enzimas, muito embora se constate que as atividades absolutas, após 90 dias sejam superiores às aquelas encontradas nas respectivas amostras que não continham benzoato de sódio, cloridrato de

cisteína e edetato dissódico, conforme se pode verificar através dos dados da tabela IV.

O efeito de agentes precipitantes sobre a estabilização da bromelina não pode ser caracterizado através dos dados da tabela IV, muito embora se consiga identificar uma ligeira superioridade do sulfato de amônio sobre a acetona, quando se comparam os resultados das provas C-II com C-I e C-IV com C-III, provas essas que apresentaram balanço material mais favorável em relação às demais.

As Fig. 16 e 17 relacionam as atividades em U.K./g, após 0 e 90 dias, A-I, B-I, C-I, D-I e E-I, obtidas com acetona de extratos de caules de abacaxizeiro filtrados a 20, 30, 40, 50 e 60°C sem ativadores; estas amostras foram armazenadas a 5 e 20°C, respectivamente.

As Fig. 18 e 19 relacionam as atividades em U.K./g, após 0 e 90 dias, de amostras de bromelina A-II, B-II, C-II, D-II e E-II, obtidas com sulfato de amônio de extratos de caules de abacaxizeiro filtrados a 20, 30, 40, 50 e 60°C, sem ativadores; estas amostras foram armazenadas a 5 e 20°C, respectivamente.

As Fig. 20 e 21 relacionam as atividades em U.K./g, após 0 e 90 dias, de amostras de bromelina A-III, B-III, C-III, D-III e E-III, obtidas com acetona de extratos de caules de abacaxizeiro filtrados a 20, 30, 40, 50 e 60°C, contendo benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e edetato

dissódico; estas amostras foram armazenadas a 5 e 20°C, respectivamente.

As Fig. 22 e 23 relacionam as atividades em U.K./g, após 0 e 90 dias, de amostras de bromelina A-IV, B-IV, C-IV, D-IV e E-IV, obtidas com sulfato de amônio de extratos de caules de abacaxizeiro filtrados a 20, 30, 40, 50 e 60°C, contendo benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e edetato dissódico; estas amostras foram armazenadas a 5 e 20°C, respectivamente.

A interpretação das Fig. 16 a 23 permite caracterizar o efeito de ativadores (benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e edetato dissódico) na estabilidade da bromelina, quando submetida a armazenamento a 5 e 20°C. A presença de ativadores em extratos filtrados a 40°C fornece bromelinas relativamente mais estáveis que aquelas obtidas de extratos filtrados em outras temperaturas.

Muito embora não tenha sido possível comprovar uma condição ótima de efeitos combinados de temperatura de filtração com ativadores e com agentes precipitantes sobre a estabilidade de bromelina em pó, está nitidamente caracterizada a importância do tratamento térmico do extrato, da presença dos ativadores (benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e edetato dissódico) e dos agentes precipitantes no processo de extração da bromelina. Pode-se supor que a bromelina em pó, após o processo de obtenção, deve ser adicionalmente protegida para consolidar

os ganhos comprovados na ativação e estabilização do extrato e no balanço material.



## 7. CONCLUSÕES

Em base às proposições estabelecidas e resultados obtidos, pode-se concluir :

- 7.1. O extrato de caules de abacaxizeiro pode ser purificado por filtração, com aumento da atividade proteolítica, por aquecimento até 50°C.
- 7.2. O tratamento térmico do extrato de caules de abacaxizeiro facilita a operação de purificação por filtração, reduzindo consideravelmente o tempo gasto quando se utilizam aquecimento a 40 e 50°C.
- 7.3. O extrato filtrado, sem adição de agentes ativadores, sofre gradual perda de sua atividade proteolítica, independentemente da temperatura de filtração, quando submetido a teste de estabilidade.
- 7.4. O extrato filtrado a 20, 30 e 40°C, contendo benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e edetato dissódico, pode ser estabilizado por um período de pelo menos 90 dias, quando armazenado entre 5 e 20°C.
- 7.5. Extrato filtrado a 60°C, com ou sem benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e edetato dissódico, sofre intensa redução da atividade proteolítica.

- 7.6. O balanço material mais favorável, expresso em unidades de atividade proteolítica, se obtém quando ao extrato filtrado a 40°C se adiciona benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e edetato dissódico, e se precipita a bromelina com sulfato de amônio.
- 7.7. A capacidade extrativa do sulfato de amônio é superior à da acetona quando se utiliza filtração do extrato entre 20 e 50°C. Com extrato aquecido a 60°C, a acetona promove maior rendimento em unidades de atividade proteolítica recuperada.
- 7.8. A recuperação da atividade proteolítica, tanto com acetona quanto com sulfato de amônio, aumenta gradualmente quando se filtra o extrato a 20, 30 e 40°C, decrescendo gradualmente com aquecimento a 50 e 60°C.
- 7.9. A bromelina precipitada por acetona e sulfato de amônio, a partir de extrato filtrado a 20°C, sem incorporação de agentes ativantes/estabilizantes, mostrou-se estável por 90 dias quando mantida a 5°C.
- 7.10. A bromelina precipitada por acetona, a partir de extrato filtrado a 30°C contendo benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e edetato dissódico, manteve-se estável por 90 dias quando mantida a 5°C.

7.11. A bromelina precipitada por sulfato de amônio, a partir de extrato filtrado a 40°C contendo benzoato de sódio, cloridrato de cisteína e edetato dissódico apresentou a maior atividade proteolítica após 90 dias, quando mantida a 5°C.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

1. ANDRADE, J.M. O emprêgo do Deazin em pacientes portadores de tuberculose pulmonar com a finalidade anticitarral e antitussígena. Rev. Bras. Med., Rio de Janeiro, 24(6): 453-5, 1967.
2. ARZU, A.; MAYORGA, H.; GONZALEZ, J.; ROLZ, C. Enzymic hydrolysis of cottonseed protein. J. Agric. Food Chem., Washington, 20(4): 805-9, 1972.
3. ASSUMPÇÃO, I.T. Resultados clínicos do emprêgo de uma associação enzimático-antibiótica no tratamento das afecções venosas agudas. Rev. Bras. Med., Rio de Janeiro, 24(2): 139-148, 1967.
4. ASSUMPÇÃO, I.T. Resultados terapêuticos com o emprêgo de nova enzima proteolítica vegetal: bromelina. Estudo clínico sôbre os efeitos anticitarrais em 50 casos. Rev. Assoc. Med. Bras., São Paulo, 13(6): 207-215, 1967.
5. BAINES, B.S.; KIERSTAN, M.P.J.; BROCKLEHURST, K. Polypeptide inhibitors of papain and bromelain. Biochem. Soc. Trans., London, 10: 171-2, 1982.

---

\* De acordo com a norma NB66/78 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI) 1990.

6. BALLS, A.K. Protein-digesting enzymes of papaya and pineapple. U.S. Dept. Agr., Circ. 631, 9 p., 1941. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 36: 1624, 1942.
7. BARUFFALDI, R.; COLOMBO, A.J.; FONTINELE, E.M.C.; RAMOS, O.H.R.; BAUCH, T.; WASZYK, A.H.; SCHUCH, R. Influência da ação de enzimas vegetais proteolíticas sobre a carne. Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo, São Paulo, 13(1): 63-74, 1975.
8. BARUFFALDI, R.; COLOMBO, A.J.; SCHUCH, R.; GIOIELLI, L.A. Ação de enzimas vegetais proteolíticas sobre a carne. An. Farm. Quim. S. Paulo, São Paulo, 21(2): 81-4, 1981.
9. BATKIN, S.; TAUSSIG, S.J.; SZEKEREZES, J. Antimetastatic effect of bromelain with or without its proteolytic and anticoagulant activity. J. Cancer Res. Clin. Oncol., Berlin, 114: 507-8, 1988.
10. BAUM, M.S. & MORCO, F.R. Meat processing. U. S. 3,215,534, 1965, 3 p. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 64: 4178d, 1966.
11. BAVISOTTO, V.S. Edible products from spent grains and yeasts. U.S. 3,212,902, 1965, 4 p. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 63: 18943a, 1965.

12. BEDDING, P.M.J. Materials and methods for cleaning soft contact lenses. Eur. Pat. Appl. 5,131, 1979, 17 p. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 92: 82467u, 1980.
13. BEDDOWS, C.G.; ISMAIL, M.; STEINKRAUS, K.H. The use of bromelain in the hydrolysis of mackarel and the investigation of fermented fish aroma. J. Food Technol., Oxford, 11(4): 379-88, 1976.
14. BERKOWITZ-HUNDERT, R.; ILANY-FEINGENBAUM, J.; LEIBOWITZ, J. Milk-clotting and proteolytic activity. Enzymologia, The Hague, 29(2): 98-100, 1965.
15. BERNDT, W.; HOFFMAN, U.; MUELLER-WEILAND, K. Properties of bromelin, a plant protease from Ananas comosus. Z. Gastroenterol., Munich, 6(3): 185-95, 1968.
16. BERNHOLDT, H.F. Corned meat products. U.S. 3,549,385, 1970, 3 p. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 74: 86583e, 1971.
17. BEUCHAT, L.R. Modification of cookie-baking properties of peanut flour by enzymic and chemical hydrolysis. Cereal Chem., St. Paul, 54(3): 405-14, 1977.
18. BEUK, J.F. & HOGAN, J.M. Proteolytic enzymes in poultry feed. U.S. 2,878,123, 1959. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 54: 4966c, 1960.

19. BEUK, J.F. & WARNER, W.D. Proteolytic enzyme formulation. U.S. 3,709,790, 1973, 6 p. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 78: 70476u, 1973.
20. BEUK, J.F.; SAVICH, A.L.; GOESER, P.A.; HOGAN, J.M. tenderization of meat. U.S. 2,903,362, 1959. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 54: 1766b, 1960.
21. BODI, T. Effects of oral bromelains on tissue permeability to antibiotics and pain response to bradykinin: double blind studies on human subjects. Clin. Med., Northfield, 73(8): 61-65, 1966.
22. CAPRIA, A. & MARCHIORO, M. Il Digenzima nella terapia delle insufficienze digestive. Minerva Gastroenterol., Torino, 17(2): 84-91, 1971.
23. CAYGILL, J.C. & ETHERINGTON, D.J. Fruit bromelain and other plant sulfhydryl proteases. Util. Enzymes Technol. Aliment. Symp. Int., Versailles, 419-21, 1982.
24. CAYLE, T. Stabilized aqueous enzyme solutions. U.S. 3,296,094, 1967, 2 p. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 67: 94009t, 1967.
25. CHAO, L.P. & LIENER, I.E. Sequence of amino acids in the vicinity of the reactive thiol group of stem bromelain. Biochem. Biophys. Res. Commun., New York, 27: 100-6, 1967.

26. CHEFTEL, C.; AHERN, M.; WANG, D.I.C.; TANNENBAUM, S.R.  
Enzymic solubilization of fish protein concentrate:  
batch studies applicable to continuous enzyme  
recycling processes. J. Agric. Food Chem.,  
Washington, 19(1): 155-61, 1971.
27. CHITTENDEN, R.H.; JOSLIN, E.P.; MAERA, F.S. Trans. Conn.  
Acad. Sci., 8:281, 1891. Apud: COOREMAN, W.M.;  
DEMEESTER, K.; LAUWERS, A. Bromelain, biochemical and  
pharmacological properties. Pharm. Acta Helv.,  
Zurich, 51(4): 73-97, 1976.
28. DAVIES, B.J. & ORNSTEIN, L. Disc electrophoresis in: gel  
electrophoresis. Ann. N. Y. Acad. Sci., New York,  
121: 305-650, 1964.
29. DU BOIS, M.W.; ANGLEMIER, A.F.; MONTGOMERY, M.W.; DAVID-  
SON, W.D. Effect of proteolysis on the emulsification  
characteristics of bovine skeletal muscle. J. Food  
Sci., Chicago, 37(1): 27-8, 1972.
30. DUPAIGNE, P. Biochemical effects of bromelains and their  
therapeutic utilization. Fruits, Paris, 30(9): 545-  
67, 1975.
31. EL GHARBAWI, M. & WHITAKER, J.R. Fractionation and  
partial characterization of the proteolytic enzymes  
of stem bromelain. Biochemistry, Washington, 2: 476-  
81, 1963.



32. EL-GHARBAWI, M. & WHITAKER, J.R. Factors affecting enzymic solubilization of beef proteins. J. Food Sci., Chicago, 28(2): 168-72, 1963.
33. ENOMOTO, T.; MINESHITA, S.; OHISHI, S.; SHIGEI, T. Kininase activity of stem bromelain. Jpn. J. Pharmacol., Kyoto, 17(2): 331-2, 1967.
34. ENZYME nomenclature. Orlando, Academic Press, 1984. p.353.
35. FEINSTEIN, G. & WHITAKER, J.R. On the molecular weights of the proteolytic enzymes of stem bromelain. Biochemistry, Washington, 3: 1050-4, 1964.
36. FOSSUM, K. Proteolytic enzymes and biological inhibitors. I. Comparison between the Kunitz method and the agar gel casein precipitating reaction for determination of the activity of some commercial proteolytic enzymes and inhibitors. Acta Pathol. Microbiol. Scand., Sect. B, Copenhagen, 78: 350-62, 1970.
37. FUGAN, P.V. Collagen casings from limed hides U.S. 3,373,046, 1968, 11 p. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 68: 96822x, 1968.
38. GALBRAITH, W. Enzymic debridement. PCT Int. Appl. 81 01,242, 1981, 29 p. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 95: 121150u, 1981.

39. GHIRINGHELLI, F.; LOCATELLI, G.R.; MAZZI, C.  
Sull'impiego della bromelina nel trattamento delle  
bronchiti croniche. Settim. Med., Roma, 53(13): 713-  
726, 1965.
40. GRUNDEN, L.P.; VADEHRA, D.V.; BAKER, R.C. Effects of  
proteolytic enzymes on the functionality of chicken  
egg albumen. J. Food Sci., Chicago, 39(4): 841-3,  
1974.
41. HAWLEY, R.L. Nonisoelectric protein. U.S. 3,830,942,  
1974, 4p. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 82: 3024q,  
1975.
42. HAZAMA, N. Bromelain activation and stabilization. Jpn.  
71-37, 866, 1971, 3 p. Apud: Chem. Abstr., Columbus,  
76: 43476w, 1972.
43. HEINICKE, R.M. & GORTNER, W.A. Stem bromelain - A new  
protease preparation from pineapple plants. Econ.  
Bot., New York, 11: 225-34, 1957.
44. HEINICKE, R.M. Complementary enzyme actions in the  
clotting of milk. Science, Washington, 118: 753-4,  
1953.
45. HEINICKE, R.M. Pineapple-stem bromelain. U.S. 3,002.801,  
1958. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 56: 3814d, 1960.

46. HEINICKE, R.M. Stabilization of bromelain preparations. U.S. 3,293.143, 1966, 10 p. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 66: 79586q, 1966.
47. HEINICKE, R.M.; LEVAND, O.; SUGAI, R.; LARSON, Ch. Supplementary proteases and gastric digestion. Exp. Med. Surg., Brooklyn, 25(2-4): 156-68, 1967.
48. HENNRICH, N.; HOFFMANN, A.; LANG, H. Eignung der Pflanzenprotease Bromelin fuer die Substitutionstherapie von Verdauungsstoerungen. Arzneim. Forsch., Aulendorf, 15: 434-6, 1965.
49. HEVIA, P. & OLCOTT, H.S. Flavor of enzyme-solubilized fish protein concentrate fractions. J. Agric. Food Chem., Washington, 25(4): 772-5, 1977.
50. HEVIA, P.; WHITTAKER, J.R.; OLCOTT, H.S. Solubilization of a fish protein concentrate with proteolytic enzymes. J. Agric. Food Chem., Washington, 24(2): 383-5, 1976.
51. HIGH, R.L. & ROGOLS, S. Activation of starch. U.S. 3,488,256, 1970, 21 p. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 72: 80623e, 1970.
52. HIYAMA, K. & OKADA, S. Effect of mucopolysaccharidases on meat tenderization by protease. Kagaku to Kogyo, Tokyo, 51(6): 243-9, 1977.

53. HOGAN, J.M. Enzyme preparations for improving tenderness of meat and meat products. Belg. 617,813, 1962, 22 p. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 58: 8360c, 1963.
54. HUSAIN, S.S. & LOWE, G. The amino acid sequence around the active-site cysteine and histidine residues of stem bromelain. Biochem. J., London, 117: 341-6, 1970.
55. HWANG, P.T. & HSU, R.S. Separation of bromelain from pineapple stem with tannic acid. Chung Kuo Nung Yeh Hsueh Hui Chih, 8: 1-7, 1970. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 74: 107452d, 1971.
56. IGARASHI, K.; TSUNEKUNI, T.; YASUI, T. Inhibition of proteolytic activity of papain by browning reaction products of quercetin. J. Nutr. Sci. Vitaminol., Tokyo, 29: 227-32, 1983.
57. ILANY-FEINGENBAUM, J.; BERKOWITZ-HUNDERT, R.; LEIBOWITZ, J. Milk coagulation and proteolysis. Enzymologia, The Hague, 31(5): 274-80, 1966.
58. ISHIHARA, H.; TAKAHASHI, N.; OGURI, S.; TEJIMA, S. Complete structure of the carbohydrate moiety of stem bromelain. An application of the almond glycopeptidase for structural studies of glycopeptides. J. Biol. Chem., Baltimore, 254(21): 10715-9, 1979.

59. JAFFÉ, W.G. The activation of papain and related plant enzymes with sodium thiosulphate. Arch. Biochem., New York, 8: 385-93, 1945.
60. JOUBERT, F.J.; TALJAARD, N.; CLARK, R.C. Sulphydryl protease inhibitors from pineapple plant stem. Int. J. Biochem., Oxford, 22(12): 1401-6, 1990.
61. KANG, C.K. & RICE, E.E. Degradation of various meat fractions by tenderizing enzymes. J. Food Sci., Chicago, 35(5): 563-5, 1970.
62. KIELY, P.G. & LARSEN, R.F. Quick-cooking cereal. U.S. 2,853,388, 1958. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 53: 1583b, 1959.
63. KIM-KANG, C.; WARNER, W.D.; RICE, E.E. Tenderization of meat with proteolytic enzymes. U.S. 3,818,106, 1974. 11 p. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 81: 134862p, 1974.
64. KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. J. Gen. Physiol., New York, 30: 291-310, 1947.
65. LAMBERT, R.; EDWARDS, J.; ANSTEE, D.J. A simple method for the standardization of proteolytic enzymes used in blood group serology. Med. Lab. Sci., London, 35(3): 233-8, 1978.

66. LIMA, D.C. & ROMANELLI, P.F. Extração e estudo de algumas propriedades bioquímicas do enzimo proteolítico do caule do abacaxi branco, variedade pérola. Colet. Inst. Tecnol. Aliment., Campinas, 8: 377-89, 1977.
67. LOTZ-WINTER, H. On the pharmacology of bromelain: an update with special regard to animal studies on dose-dependent effects. Planta Med., Stuttgart, 56(3): 249-53, 1990.
68. MARCANO, V. Apoth. Ztg., 5:33, 1891. Apud: COOREMAN, W.M.; DEMEESTER, K.; LAUWERS, A. Bromelain, biochemical and pharmacological properties. Pharm. Acta Helv., Zurich, 51(4): 73-97, 1976.
69. MARIN, L.A.; PADRÓ, R.; FIGUEROA, I.B.; VINCENTY, C. Recovery of bromelin, a proteolytic enzyme, from the pineapple stump. Rev. Col. Quim. Puerto Rico, Rio Piedras, 16: 39-42, 1959.
70. MAURER, H.R.; HOZUMI, M.; HONMA, Y.; OKABE-KADO, J. Bromelain induces the differentiation of the leukemic cells in vitro: an explanation for its cytostatics effects? Planta Med., Stuttgart, 54(5): 377-81, 1988.
71. MEURENS, M.J.G.G. Clarification of fruit and vegetable juices. Belg. 807,407, 1974, 12 p. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 81: 134876w, 1974.

72. MURATA, K.; KUSAKABE, I.; KOBAYASHI, H.; AKAIKE, M.; MURAKAMI, K. Coagulation of proteins in leguminous milk by commercial proteinases. Agric. Biol. Chem., Tokyo, 52(5): 1317-8, 1988.
73. NAKAUE, K.; SUGIHASHI, T.; TOKIWA, K.; HAYASHI, S.; IKEDA, S.; SUZUKI, T.; NISHIWAKI, M.; NAGAZAKI, F. Feeds for poultry. Jpn. 71 05,000, 1971, 3 p. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 75: 128655h, 1971.
74. NATIONAL DRUG CO. Stabilization of proteolytic enzymes. Brit. 802.069, 1958. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 53: 9583h, 1959.
75. OMAR, S.; IDRUS, A.Z.; ABDUL, R. Extraction and activity of bromelain from pineapple. MARDI Res. Bull., Serdang, 6: 172-9, 1978.
76. ONESON, I.B. Soluble collagen. U.S. 3,131,130, 1964, 2 p. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 61: 3352d, 1964.
77. OPPER, A.W. & MILLER, J.M. The inhibition of bromelain. Exp. Med. Surg., Brooklyn, 25: 185-91, 1967.
78. OTA, O.; FU, T.H. & HIROHATA, R. Bromelain II. J. Biochem., Tokyo, 49: 532-7, 1961.

79. OTA, S.; HORIE, E.; HAGINO, F.; HASHIMOTO, C.; DATE, H. Fractionation and some properties of the proteolytically active components of bromelains in the stem and the fruit of the pineapple plant. J. Biochem., Tokyo, 71: 817-30, 1972.
80. OTA, S.; HORIE, K.; HAGINO, F. Heterogeneity of bromelain of the pineapple stalk. J. Biochem., Tokyo, 66: 413-4, 1969.
81. OTA, S.; UMI, H.; MUTA, E.; OKAMOTO, Y. Chemical modification of stem bromelain I-1 and fruit bromelain A with 2-hydroxy-5-nitrobenzyl bromide, tetranitromethane and hydrogen peroxide. J. Biochem., Tokyo, 78: 627-35, 1975.
82. PARK, Y.K. & DRAETA, I.S. Aplicação de enzimas proteolíticas no amaciamento da carne de boi. Rev. Bras. Tecnol., São Paulo, 2(3): 125-9, 1971.
83. PECKOLT, T. & PECKOLT, G. História das plantas medicinaes e úteis do Brasil. Rio de Janeiro, Laemmert, 1888. p.175-95.
84. PERSTEIN, S.H. & KÉZDY, F.J. Isolation and characterization of a protease inhibitor from commercial stem bromelain acetone powder. J. Supramol. Struct., New York, 1: 249-54, 1973.



85. PIROFSKY, B. & MANGUM, M.E. Use of bromelin to demonstrate erythrocyte antibodies. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., New York, 101: 49-52, 1959.
86. PIROFSKY, B. The use of bromelin in establishing a standard cross-match. Am. J. Clin. Pathol., Philadelphia, 32(4): 350-6, 1959.
87. POZZAR-HAJNAL, L.; VAMOS-VIGYAZO, L.; NONN-SAS, H.; HEGEDUS-VOLGYESI, E. Milk clotting enzymes studied from the point of view of cheese production. III. Selective inhibition of proteolytic activity of plant proteases. Elelmiszertudomány, Budapest, 3(2): 35-70, 1969.
88. RÉDDY, M.N.; KEIM, P.S.; HEINRIKSON, R.L.; KÉZDY, F.J. Primary structural analysis of sulphhydryl protease inhibitors from pineapple stem. J. Biol. Chem., Baltimore, 260: 1741-50, 1978.
89. RICE, E.E. & LANTERO, O.J.Jr. Cheese manufacture using proteolytic enzymes. Can. 943,810, 1974, 15 p. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 81: 90123s, 1974.
90. ROWAN, A.D.; BUTTLE, D.J.; BARRETT, A.J. The cysteine proteinases of the pineapple plant. Biochem. J., London, 266: 869-75, 1990.

91. RUTMAN, M. High-energy fish protein concentrate. U.S. 3,561,973, 1971, 3 p. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 75: 117348j, 1971.
92. SCHACK, W.R. & CONNICK, F.G. Preparation of meat piece using proteolytic enzymes. U.S. 3,533,803, 1970, 3 p. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 74: 12009a, 1971.
93. SCOCCA, J. & LEE, Y.C. The composition and structure of the carbohydrate of pineapple stem bromelain. J. Biol. Chem., Baltimore, 244: 4852-63, 1969.
94. SEKUL, A.A. & ORY, R.L. Rapid enzymic method for partial hydrolysis of oilseed proteins for food uses. J. Am. Oil Chem. Soc., Champaign, 54(1): 32-5, 1977.
95. SHERRY, S. & FLETCHER, P. Proteolytic enzymes: a therapeutic evaluation. Clin. Pharmacol. Ther., St. Louis, 1: 202-26, 1960.
96. SHIGEI, T.; SAKUMA, A.; ENOMOTO, T.; OHISHI, S.; HATANO, R. Pulmonary edema induced by adrenaline and related amines in rats, and its modification by various pretreatments. Jpn. J. Pharmacol., Kyoto, 17(4): 591-602, 1967.
97. SILVERSTEIN, R.M. & KEZDY, F.J. Separation and characterization of proteases from stem bromelain. Fed. Proc., Washington, 29: 929, 1970. [Abstracts].

98. SOUZA, A.H. Bromelina. Rev. Soc. Bras. Quim., Rio de Janeiro, 17: 67-80, 1948.
99. STABILE, M.N.O. Otimização do processo biotecnológico de hidrólise de carne bovina. São Paulo, 1991. 167p. [Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP].
100. STAMBUK, J.D. Determination of iron, potassium, magnesium and calcium in crude bromelin from plants by atomic absorption spectrophotometry. Rev. Univ. Ind. Santander, Bucaramanga, 8: 57-9, 1967.
101. Standards for bread: use of enzyme bromelain as an optional ingredient. Fed. Req., 29: 7712-13, 1964. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 61: 7600d, 1964.
102. SUBRAMANIAN, N.; CARTAXO, M.E.Q.; SUBRAMANIAN, S.; FARIAS, J.L. Study of bromelain present in the pineapple plant of Paraíba. Ciênc. Cult., São Paulo, 30(11): 1326-32, 1978.
103. SUMI, H. & TOKI, N. Inhibitors of acrosin and sulphhydryl protease in normal human urine. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., New York, 167: 530-5, 1981.
104. TAIZO, A. Hair tonic compositions containing glibberelins and proteolytic enzymes (Kakudai Shosan K.K.) Eur. Pat. Appl. EP 79,074, 1983, 12 p. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 99: 58737f, 1983.

105. TAKAHASHI, N.; YASUDA, Y.; GOTO, K.; MIYAKE, T.; MURACHI, T. Multiple molecular forms of stem bromelain. Isolation and characterization of two closely related components SB1 and SB2. J. Biochem., Tokyo, 74(2): 355-73, 1973.
106. TAKIUCHI, I.; TAKAGI, H.; SEI, Y.; HIGUSHI, D. Isolation and characterization of a low molecular weight (2,200 Mr) proteinase inhibitor of human epidermis. Biol. Role Proteinases Their Inhib. Skin, 1986. p.197-204 [Proc. Int. Symp., 1st 1984]. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 105: 167777g, 1986.
107. TANIMOTO, T.; FUKUDA, H.; KAWAMURA, J. Assay of enzyme preparations. III. Bromelain preparation containing trypsin. Eisei Shikensho Hokoku, 101: 79-83, 1983. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 101: 2736x, 1984.
108. TAUSSIG, S.J. & BATKIN, S. Bromelain, the enzyme complex of pineapple (Ananas comosus) and its clinical application. An update. J. Ethnopharmacol., Lausanne, 22(2): 191-203, 1988.
109. TAUSSIG, S.J. Biochemical effects of bromelain in oncology. Erfahrungsheilkunde, Heidelberg, 31(8): 646-52, 1982.
110. TAUSSIG, S.J. Effect of bromelain as an anticoagulant and its significance as an antimetastatic. Erfahrungsheilkunde, Heidelberg, 33(6): 342-8, 1984.

111. TAUSSIG, S.J.; SZEKEREZES, J.; BATKIN, S. Inhibition of tumour growth in vitro by bromelain, an extract of the pineapple plant (Ananas comosus). Planta Med., Stuttgart, 6: 528-9, 1985.
112. TSEN, C.C. & TAPPEL, A.L. Meat tenderization. III. Hydrolysis of actomyosin, actin, and collagen by papain. Food Res., Champaign, 24: 362-4, 1959.
113. TSUZUKI, H.; OKA, T.; MORIHARA, K. A chloroacetyl peptide derivative as an inhibitor of thiol proteases. Agric. Biol. Chem., Tokyo, 49: 241-2, 1985.
114. TSUZUKI, T. Edible collagen film. Ger. Offen. 1,960,935, 1968, 25 p. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 74: 30882j, 1971.
115. UEDA, S.; HAYASHI, Y.; TAKIGUCHI, M. Fermentative production of gum superior in transparency. Jpn. Kokai Tokkyo Koho 79,105,295, 1979, 3 p. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 92: 4716k, 1980.
116. UNDERKOFLE, L.A. Tenderization of meat. U. S. 2,904,442, 1959. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 54: 1766c, 1960.
117. WALKER, J.M. & CHAPLIN, S.C. A thiol inhibitor produced by Aspergillus niger. J. Gen. Microbiol., Colchester, 129: 735-8, 1983.

118. WEIR, C.E.; WANG, H.; BIRKNER, M.L.; PARSONS, J.; GINGER, B. Enzymic tenderization of meat. II. Panel and histological analyses of meat treated with liquid tenderizers containing papain. Food Res., Champaign, 23: 411-22, 1958.
119. WILDI, B.S. & BOYCE, D.C. Chillproofing of beverages using insoluble polymer-enzyme products. U.S. 3,597,219, 1971, 10 p. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 75: 128508n, 1971.
120. YASUDA, Y.; TAKAHASHI, N.; MURACHI, T. The composition and structure of the carbohydrate moiety of stem bromelain. Biochemistry, Washington, 9: 25-32, 1970.
121. YOSHIMOTO, K.; YANAGIYA, T.; MIKAMI, M.; MIURA, H. Effectiveness of various enzymes on the connective tissue fraction of beef. Obihiro Chikusan Daigaku Gokujutsu Kenkyu Hokoku, 8(3): 405-15, 1974.
122. ZIMACHEVA, A.V.; IEVLEVA, E.V.; MOSOLOV, V.V. Isolation and properties of cysteine proteinase inhibitors from potato tubers. Biokhimiya, Moscow, 49: 1153-8, 1984.