Biotecnologia

BROMELINA OBTIDA DO RESÍDUO DO CAULE DO ABACAXIZEIRO (*Ananas comosus var. comosus)* E SUA INIBIÇÃO POR MICROORGANISMOS CAUSADORES DA PODRIDÃO ESPUMOSA.

Fábio de Alencar Menezes[1a]; Helber Barcellos da Costa[2a]; Adriana Márcia Nicolau Korres[3a] Patricia Machado Bueno Fernandes[4a]; José Aires Ventura[5b]

[1]Mestrando em Biotecnologia; [2] Doutorando em Biotecnologia; [3] Doutora em Biotecnologia [4] Doutora em Bioquímica; Professor Associado da UFES; [5] Doutor em Fitopatologia, Chefe de Pesquisa do Incaper e Pesquisador Convidado da UFES. [a]Núcleo de Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo. [b]Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural Vitória-ES, Brazil.

INTRODUÇÃO

A fruticultura é uma atividade do agronegócio com um vasto dinamismo mundial que rende perspectivas econômicas significativas. O abacaxi é um fruto das regiões tropicais e subtropicais, de grande aceitação em todo o mundo, quer *in natura*, quer industrializado. O fruto é a parte comercializável da planta, porém, esta porção representa apenas uma parte do seu todo, enquanto que o restante formado por caule, folha, casca, coroa e mudas, é considerado resíduo agrícola e não tem sido devidamente aproveitado, resultando em perda de oportunidade econômica para os produtores rurais (COSTA, 2010).

A Bromelina é um grupo de enzimas proteolíticas da família das cisteíno-proteases, presentes nos tecidos do abacaxizeiro. Esta enzima obtida dos resíduos do cultivo do abacaxizeiro tem alto valor comercial, sendo utilizada na indústria alimentícia, têxtil, cosmética, cervejeira e farmacêutica, além da importante aplicabilidade na medicina. (COSTA, 2010).

Apesar do cultivo do abacaxi estar em franca expansão no Brasil, há diversas doenças que comprometem esta cultura. Destaca-se a podridão espumosa, doença causada por

associação entre leveduras (*Candida krusei, Saccharomyces cerevisae, Kloeckera apis*) e bactéria (*Klebsiella pneumoniae* subsp. *Pneumoniae*), e que ocorre em frutos tanto no campo como em pós-colheita (KORRES, 2010).

Muitas cisteíno-proteases de plantas têm demonstrado atuação na resposta a fitopatógenos, atacando os organismos invasores (VAN DER HOORN, 2008; BAEK; CHOI, 2008). O presente trabalho pretende avaliar a inibição da bromelina por leveduras causadoras da podridão espumosa na tentativa de verificar a presença de inibidores enzimáticos nos microorganismos. Além disso, esse trabalho abre um novo caminho para o uso da bromelina na agricultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Purificação de bromelina dos resíduos agrícolas do abacaxi cv. Vitória

Os resíduos agrícolas foram obtidos na fazenda experimental do Incaper em Sooretama-ES e processados no Laboratório de Biotecnologia do Agronegócio da UFES. A Bromelina do caule foi purificada de acordo com Costa (2010).

Isolamento de leveduras e obtenção dos extratos intra e extracelulares

Os microrganismos causadores da podridão espumosa (*Candida krusei, Saccharomyces cerevisae, Kloeckera apis*), foram isolados a partir de frutos sintomáticos de abacaxi das cultivares Pérola, Gold e Vitória. (KORRES, 2010). A partir do isolamento e crescimento dos microorganismos os extratos intra e extracelulares eram obtidos. Por meio de centrifugação, recolhia-se o sobrenadante e obtinha-se o extrato extracelular e após rompimento celular os extratos intracelulares eram obtidos.

Atividade proteolítica de bromelina e dos extratos de leveduras

Após a purificação da Bromelina, sua atividade proteolítica foi dosada conforme Depeau (1976), bem como também foi dosada a atividade proteolítica dos extratos extra e intracelulares dos microorganismos seguindo o mesmo protocolo.

Atividade inibitória de bromelina dos extratos de microorganismos

A atividade inibitória foi determinada por meio da comparação da atividade enzimática da solução de bromelina contendo os inibidores (extratos intra e extracelulares) com a atividade da solução de bromelina sem os inibidores, seguindo o método de Kunitz modificado por Arnon (1970) com modificações. Foi considerado que uma unidade de atividade inibitória

(UI) é a concentração necessária para se inibir a atividade proteolitica da bromelina em 50%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Bromelina purificada a partir dos resíduos de caule apresentou atividade proteolítica de 10,15 U/mL de enzima. Os valores de atividade proteolítica dos extratos de leveduras, foram superiores na porção extracelular dos microrganismos e apontaram também a presença destas enzimas no interior das células, que foram consideradas nas etapas de cálculo da atividade inibitória de Bromelina (Figura 1).

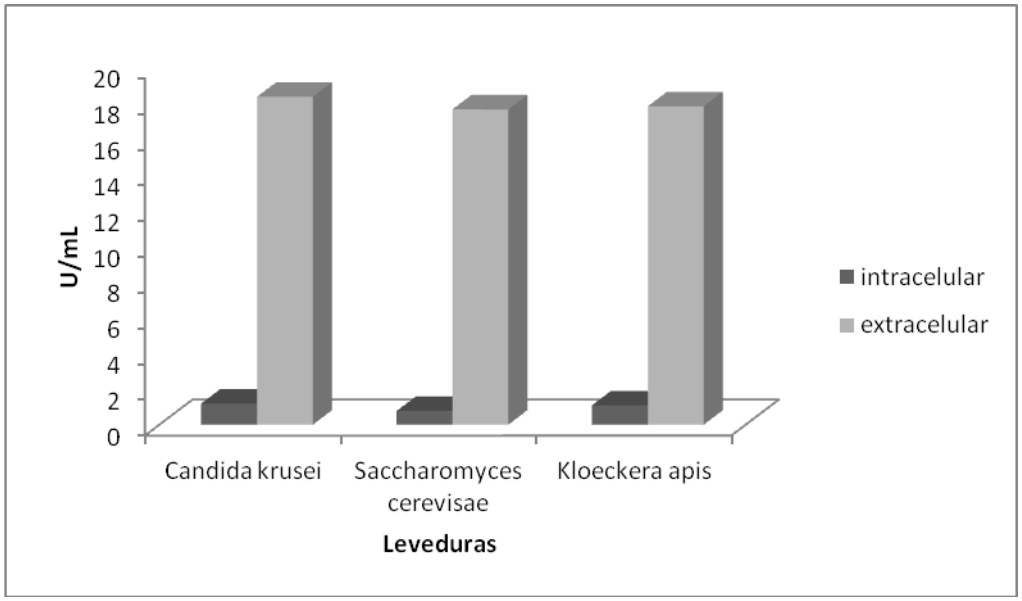


FIGURA 1 - Atividade proteolítica dos extratos de leveduras.

Os valores de atividade proteolítica dos Extratos de levedura + Solução de Bromelina foram superiores também no extrato extracelular quando comparados ao extrato intracelular (Figura 2)

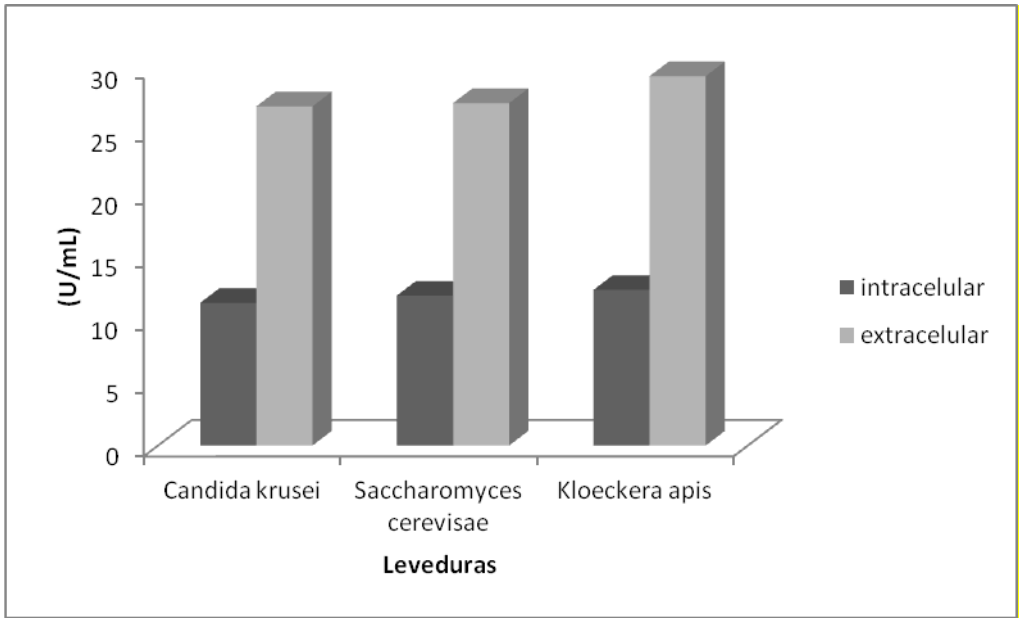


FIGURA 2 - Atividade proteolítica de bromelina em presença dos extratos de leveduras.

Os resultados indicam a presença de inibidores de bromelina nos extratos de duas das leveduras pesquisadas (*Candida krusei* e *Saccharomyces cerevisae*), uma vez que houve uma diminuição da atividade enzimática total esperada do complexo Bromelina+Extrato Microbiano (Figura 2). Os valores de atividade inibitória de bromelina (UI) para *Candida krusei* e *Saccharomyces cerevisae* foram respectivamente de 0,309 UI e 0,120 UI.

CONCLUSÕES

Os resultados preliminares indicam a presença de inibidores de protease nos extratos das leveduras *Candida krusei* e *Saccharomyces cerevisae.* Porém, trabalhos futuros precisam ser realizados na busca e purificação de inibidores específicos de bromelina. Além disso, sugere-se uma nova aplicação biotecnológica de bromelina obtida a partir de resíduos agrícolas do abacaxizeiro, em experimentos que até então proteases comerciais eram utilizadas.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, CAPES, FAPES, FACITEC, FINEP e Banco do Nordeste pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

ARNON, R. Papain. In: PERLMANN, G.; LORANF, L. **Methods in Enzimology.** Nova York: Academic Press, p. 226-244,1970.

BAEK, K. H.; CHOI, D. Role of plant proteases in Pathogen defense. **The Plant Pathology Journal.** Coréia do sul. p. 367-374. 2008.

COSTA, H. B**. Extração e purificação de bromelina do caule do abacaxizeiro (A*nanas comosus* var. *comosus)* cv. Vitória** 110 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. 2010.

DEPEAU, G. R. **Methods in Enzimology**. v. 45. New York: Academic Press, 1976.

VAN DER HOORN, R. A. L. Plant Proteases: from photypes to molecular mechanisms. **Annu. Rev. Plant.** Palo Alto, Estados Unidos. p. 191-223. 2008.

KORRES, A. M. N. **Caracterização da etiologia da podridão espumosa do abacaxi.** 172 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. 2010.