

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DIRETORIA DE GRADUAÇÃO E EDUCAÇÃO PROFISSIONAL
COORDENAÇÃO DO CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS QUÍMICOS

JOÃO PEDRO DE OLIVEIRA FERNANDES

**AVALIAÇÃO DO USO DE ULTRASSOM NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE
BROMELINA DO CAULE DE ABACAXIZEIRO**

TOLEDO, PR
2021

JOÃO PEDRO DE OLIVEIRA FERNANDES

**AVALIAÇÃO DO USO DE ULTRASSOM NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE
BROMELINA DO CAULE DE ABACAXIZEIRO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos (COPEQ) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, câmpus Toledo, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Orientadora: Dra. Michelle M. Detoni Zanette

TOLEDO, PR
2021

JOÃO PEDRO DE OLIVEIRA FERNANDES

**AVALIAÇÃO DO USO DE ULTRASSOM NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE
BROMELINA DO CAULE DE ABACAXIZEIRO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do curso de Tecnologia em Processos Químicos da UTFPR, câmpus Toledo, como parte das exigências para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Aprovado em 30, de abril de 2021.

Banca examinadora

Prof^a Dra. Michelle Maria Detoni Zanette
UTFPR, câmpus Toledo
Orientadora

Prof Dr. Ricardo Fiori Zara
UTFPR, câmpus Toledo
Avaliador

Prof^a Dra. Ana Paula Sone
SENAI, câmpus Toledo
Avaliador

OBS: A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso de Tecnologia em Processos Químicos.

Resumo

Bromelina é o nome utilizado para designar o conjunto de enzimas proteolíticas que estão presentes em todo o abacaxizeiro. A bromelina possui consideráveis aplicações no setor têxtil, alimentício, e principalmente, no farmacêutico, sendo assim, a otimização dos processos de extração e purificação é de fundamental importância. Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da utilização de ondas ultrassônicas na extração de bromelina do caule do abacaxizeiro, utilizando água como solvente. Foram considerados três fatores em dois níveis, a saber: temperatura (9°C, 25°C), potência do equipamento (20%, 90%) e tempo de extração (1 min, 9 min). Os caules foram fragmentados, e submetidos duas vezes, em sequência, a um extrator centrífugo de frutas. Ao material resultante foi acrescentado água destilada, na proporção de 1:2,5 (m/v) de tecido vegetal/água, e então ele foi submetido ao sonicador de ponteira. A avaliação do processo foi feita através das análises do conteúdo de proteína e atividade enzimática. Os melhores resultados para o processo foram obtidos quando utilizado a temperatura de 25°C, 20% da potência do equipamento e tempo de extração de 9 minutos. O extrato obtido com o auxílio do ultrassom apresentou melhores resultados, sendo a atividade enzimática 3,6 vezes maior e o conteúdo de proteína 1,1 vezes maior, quando comparado com o extrato obtido sem o uso desta técnica, mostrando que este método atua de maneira positiva na obtenção do extrato.

Palavras-chave: ultrassom; bromelina; extração.

Abstract

Bromelain is the name used to designate the set of proteolytic enzymes that are present throughout the pineapple. Bromelain has considerable applications in the textile, food, and especially in the pharmaceutical sector, therefore, the optimization of extraction and purification processes is of fundamental importance. This work aimed to evaluate the influence of the use of ultrasonic waves in the extraction of bromelain from the stem of the pineapple, using water as a solvent. Three factors were considered at two levels, namely: temperature (9 ° C, 25 ° C), power of the equipment (20%, 90%) and extraction time (1 min, 9 min). The stems were fragmented, and subjected twice, in sequence, to a centrifugal fruit extractor. To the resulting material, distilled water was added, in the proportion of 1: 2.5 (m/v) of plant tissue / water, and then it was subjected to the tip sonicator. The evaluation of the process was done through the analysis of protein content and enzymatic activity. The best results for the process were obtained when used at a temperature of 25 ° C, 20% of the equipment's power and extraction time of 9 minutes. The extract obtained with the aid of ultrasound showed better results, with enzyme activity 3.6 times greater and the protein content 1.1 times greater, when compared with the extract obtained without the use of this technique, showing that this method acts positive way in obtaining the extract.

Keywords: ultrasound; bromelain; extraction.

Lista de tabelas

Tabela 1 – Produção brasileira de abacaxi em 2018	13
Tabela 2 – Fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial 2^3 com triplicata no ponto central, para a extração com auxílio de ultrassom.....	26
Tabela 3 – Fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central, para a extração sem auxílio de ultrassom	26
Tabela 4 – Resultados de conteúdo de proteína, atividade enzimática e atividade específica sem ultrassom	28
Tabela 5 – Resultados de conteúdo de proteína, atividade enzimática, e atividade específica com ultrassom.....	29
Tabela 6 – Análise de Variância - Conteúdo de Proteína.....	29
Tabela 7 – Teste de Tukey com nível de confiança de 95% - Conteúdo de Proteína	30
Tabela 8 – Análise de Variância - Atividade Enzimática.....	30
Tabela 9 – Teste de Tukey com nível de confiança de 95% – Atividade Enzimática.....	31
Tabela 10 – Análise de Variância - Atividade Específica	31
Tabela 11 – Teste de Tukey com nível de confiança de 95% – Atividade Específica	32
Tabela 12. Análise de Variância – Conteúdo de Proteína, amostras obtidas com e sem uso de ultrassom.....	36
Tabela 13. Teste de Tukey com nível de confiança de 95% - Conteúdo de Proteína, amostras obtidas com e sem uso de ultrassom.....	36
Tabela 14. Análise de Variância – Atividade Enzimática, amostras obtidas com e sem uso de ultrassom.....	37
Tabela 15. Teste de Tukey com nível de confiança de 95% - Atividade Enzimática, amostras obtidas com e sem uso de ultrassom.....	37
Tabela 16. Análise de Variância – Atividade Específica, amostras obtidas com e sem uso de ultrassom.....	38
Tabela 17. Teste de Tukey com nível de confiança de 95% - Atividade Específica, amostras obtidas com e sem uso de ultrassom.....	38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo geral	10
2.2 Objetivos específicos	10
3. JUSTIFICATIVA	11
4. REVISÃO DE LITERATURA	12
4.1 Abacaxi	12
4.2 Proteínas	14
4.3 Enzimas	15
4.3.1 Proteases	19
4.4 Bromelina	20
4.5 Processos de Extração de Enzimas	21
4.6 Ultrassom	22
5. MATERIAL E MÉTODOS	26
5.1 Matéria-prima	26
5.2 Obtenção do Extrato Bruto	26
5.3 Determinação do Conteúdo de Proteínas	27
5.4 Determinação da Atividade Enzimática	27
5.5 Determinação da Atividade Especifica	27
5.6 Tratamento Estatístico	28
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
7. CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41

1. INTRODUÇÃO

O abacaxizeiro é uma planta oriunda das Américas referente à família *Bromeliaceae*, sendo esta composta por volta de 2700 espécies, subdividida em 56 gêneros (CRESTANI *et al.*, 2010), tendo como fruta o *Ananas comosus* (L.) Merril, corriqueiramente chamado de abacaxi, que possui um sabor doce, relativamente ácido e carne muito succulenta (ABACAXI, 2020). Para o desenvolvimento do abacaxizeiro é necessário um clima mesotérmico, sendo as temperaturas de 22 a 32°C consideradas ideais para seu crescimento (MATHIAS, 2013). No Brasil a colheita das frutas ainda não é realizada de maneira mecanizada, mas sim de maneira rudimentar, em que coletores auxiliados por luvas de lona grossa e facão realizam o processo, isso ocorre, pois às frutas não amadurecem todas de maneira igualitária (BORRACINI, 2006).

A bromelina é um conjunto de enzimas proteolíticas que está presente em todo o abacaxizeiro, porém encontra-se em maior quantidade na região do caule da planta (ZANETTE *et al.*, 2017). Esta é uma enzima intracelular que possui atividades terapêuticas como, por exemplo, ação anti-inflamatória, diurética e depurativa, além de, auxiliar na digestão, em razão disso, a indústria farmacêutica possui um alto interesse na mesma, visto seu potencial econômico (CRESTANI *et al.*, 2010). Além do setor farmacêutico, a bromelina apresenta relevância para a área alimentícia, pois a mesma pode ser empregada para o amaciamento de carnes, no pré-tratamento de soja, entre outros (BORRACINI, 2006).

Os processos de extração de enzimas baseiam-se na destruição da parede celular para se obter o produto intracelular (MACHADO JR., 2014). Os métodos existentes para promover o rompimento da parede celular são os mecânicos, e os não mecânicos. Dentre os métodos não mecânicos pode-se citar como exemplo, extrações por detergentes, por *lise* enzimática, já dentre os métodos mecânicos pode-se citar a extração por homogeneizador a alta pressão, e por ultrassom (HARRISON, 1991; HO *et al.*, 2006 apud DE SÁ LEITÃO, 2017) que será o foco deste estudo.

Segundo DA LUZ (1998), a utilização do ultrassom para a extração tem como benefícios o baixo custo, devido a esta técnica não utilizar reagentes químicos no processo de extração, a agilidade no processamento de amostras, a possibilidade do uso para uma extensa faixa de tamanho da amostra, entre outros. Este método parte do princípio de empregar a energia das ondas sonoras de alta potência para gerar o fenômeno da cavitação no meio, sendo este responsável por ocasionar o rompimento da parede celular.

Na literatura já existe um estudo realizado por ZANETTE *et al.* (2017) que avalia a influência do ultrassom na extração de bromelina utilizando como variável o controle da temperatura, a potência do ultrassom e diferentes proporções de tecido vegetal:água, mas trabalhando com um volume variável. Este trabalho avaliou a extração de bromelina presente no caule do abacaxizeiro auxiliada por ultrassom, trabalhando com a proporção 1:2,5 (m/v) de tecido vegetal/água, em volume fixo (140 mL), variando as seguintes condições experimentais: temperatura, potência do equipamento e tempo de extração.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência da utilização de ondas ultrassônicas na extração de bromelina do caule do abacaxizeiro, em volume fixo, avaliando a influência da variação da temperatura, tempo e potência.

2.2 Objetivos específicos

- Obter o extrato bruto de bromelina, submetendo o caule fracionado com água destilada ao sonicador de ponteira, mantendo o volume constante, variando as condições experimentais (temperatura, potência do equipamento e tempo de extração);
- Analisar o conteúdo de proteína, a atividade enzimática e a atividade específica da bromelina dos extratos obtidos em diferentes condições experimentais;
- Analisar os resultados obtidos buscando identificar a influência da temperatura, tempo e potência no uso do ultrassom.

3. JUSTIFICATIVA

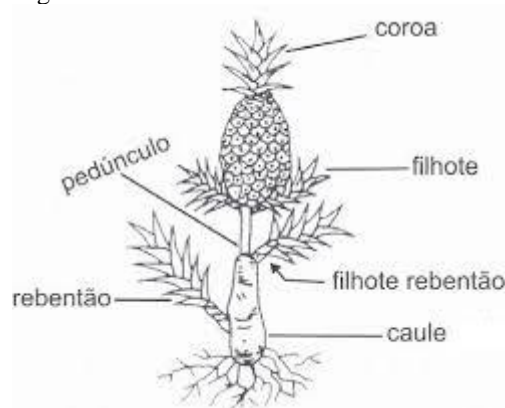
Devido à escassez de dados disponíveis na literatura a respeito da aplicação do ultrassom para a extração de bromelina, o presente trabalho se justifica através da avaliação da influência do uso de ondas ultrassônicas na extração de bromelina do caule do abacaxizeiro, verificando se tal método de extração apresenta eficiência. A extração por ultrassom tem como vantagens, o menor custo, se comparado com outros métodos de extração, a rapidez no processamento de amostras, a capacidade de ser empregada para uma grande faixa de tamanho da amostra, podendo esta técnica ser utilizada como uma alternativa para se reaproveitar o resíduo gerado na colheita do abacaxi, neste caso o caule, que está disponível em grandes quantidades, devido ao Brasil ser um dos maiores produtores mundiais de abacaxi, e assim, obter a bromelina que possui valor agregado e ampla aplicação no setor industrial.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Abacaxi

O *Ananas comosus* (L.) Merrill, popularmente chamado de abacaxi, é uma fruta tropical pertencente à família botânica *Bromeliaceae*, que possui um sabor doce, relativamente ácido e carne muito succulenta. O abacaxi é uma fruta originária da América Tropical, podendo ela ser cultivada em países que apresentam clima tropical e subtropical. O abacaxizeiro é uma planta herbácea, que apresenta caule pouco desenvolvido, folhas lineares, alongadas, em forma de calhas e dispostas em torno de um eixo central, e pode chegar a 1 metro de altura. Segundo alguns relatos históricos, o abacaxi foi encontrado, para o velho mundo, no dia 4 de novembro de 1493, por Cristóvão Colombo, quando o mesmo descobriu a ilha de Guadalupe, sendo que o fruto nessa época já era bastante difundido na América Tropical, tendo um papel importante na alimentação dos indígenas (ABACAXI, 2020). Na figura a seguir está apresentado a estrutura do abacaxizeiro.

Figura 1. Estrutura do abacaxizeiro



Fonte: COLEÇÃO PLANTAR, 2006

O abacaxizeiro é uma planta que necessita um clima quente ou mesotérmico para seu crescimento, temperaturas entre 22 a 32°C são ideais para seu desenvolvimento (MATHIAS, 2013), já temperaturas acima de 40°C causam à queima do fruto e das folhas do abacaxizeiro (DE MATOS *et al.*, 2006). Devido aos frutos do abacaxizal não atingirem o amadurecimento de maneira uniforme, a sua colheita não pode ser mecanizada, sendo assim, a mesma é realizada de maneira rudimentar, ou seja, por coletores, que utilizam luvas de lona grossa e facão para auxiliá-los no processo (RUDOLFO; REINHARDT, 2000).

O período da colheita do abacaxi depende da finalidade o qual o fruto será destinado. Se os frutos forem destinados para a produção de conservas, eles devem ser colhidos quando estiverem maduros (período na qual as qualidades organolépticas são ótimas), mas caso os

abacaxis sejam direcionados a exportação como fruta fresca, os frutos devem ser colhidos antes de se atingir o amadurecimento, para que o amadurecimento completo não aconteça antes do abacaxi chegar aos consumidores (GODOI, 2007).

Segundo Oliveira Neto (2020) o continente asiático é o maior produtor mundial de abacaxi, sendo ele responsável por 43,63% da produção mundial da fruta (67,4 milhões de toneladas). O continente americano fica em segundo lugar, produzindo 57,04 milhões de toneladas anualmente, o que representa 36,91% da produção mundial da fruta. O continente africano é o terceiro maior produtor, com representatividade de 19% na produção mundial (29,4 milhões de toneladas). Os 0,46% restantes da produção mundial são atribuídos a Europa e Oceania. O Brasil é um dos países que se destacam na produção mundial de abacaxis, em que a sua participação na produção chega a 9,89%.

Dentre os estados brasileiros, Pará, Paraíba, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo são os que mais se destacam na produção anual de abacaxi. A Tabela 1 traz a produção brasileira de abacaxi no ano de 2018 (PRODUÇÃO, 2019).

Tabela 1. Produção brasileira de abacaxi em 2018

Estado	Área Colhida (hectare)	Produção (mil frutos)	Rendimento (frutos/hectare)
Pará	18.779	426.780	22.726
Paraíba	10.912	334.880	30.689
Minas Gerais	6.390	192.189	30.077
Rio de Janeiro	4.557	142.258	31.217
São Paulo	3.371	95.156	28.228
Outros	27.544	575.723	20.902
Brasil	71.553	1.766.986	24.695

Fonte: PRODUÇÃO, 2019

A composição química do abacaxi apresenta uma alta oscilação, sendo esta decorrente do período no qual o fruto é cultivado. Em geral, o cultivo acontece no verão, sendo o período de colheita padronizada por meio da indução química do seu florescimento. Em tal caso, as frutas têm elevados teores de açúcares e baixos teores de acidez. Em contrapartida, as frutas produzidas fora de época, possuem maiores teores de acidez e menores teores de açúcares, devido ao cultivo acontecer nos meses que a temperatura ambiente é menos elevada (CÉSAR, 2005).

O valor nutricional do abacaxi varia de acordo com os seus açúcares solúveis, suas vitaminas e seus sais minerais, visto que os níveis de lipídios e de proteína são parcialmente baixos. A concentração de açúcares oscila entre 12 a 15%, em que por volta de 66% são de sacarose e 34% de açúcares redutores. As cinzas, que representam de 0,4 a 0,6% da massa total, são compostas basicamente por potássio, magnésio e cálcio. Tais atributos mantêm em grande parte nos resíduos processados do abacaxi para a obtenção da bromelina, desta forma há um alto interesse nestes resíduos devido às propriedades nutritivas (BORRACINI, 2006).

Devido à alta produção, o cultivo do abacaxi acaba gerando uma grande quantidade de resíduo agrícola, como por exemplo, caule, folha, casca, coroa e talos. A polpa do abacaxi, que corresponde a 63% do total da planta, é a fração comercializável da fruta, sendo que os 37% restantes, compostos pelo caule, folha, casca, coroa e talo é tratado como resíduo agrícola, e este não é utilizado da melhor maneira possível, ocasionando perdas econômicas e problemas ambientais. Desta forma, o emprego destes resíduos resultantes da produção do abacaxi é uma alternativa sustentável para a obtenção de bromelina, que apresenta valor comercial e biotecnológico agregado (BALDINI *et al.*, 1993 apud FERREIRA *et al.*, 2017).

4.2 Proteínas

As proteínas são as moléculas orgânicas presentes em maior quantidade nas células, chegando a representar 50% ou mais do peso seco delas, elas estão presentes em todas as partes das células, dado que são essenciais sob todos os aspectos da função e estrutura celular. Há uma grande variedade de espécies de proteínas, sendo que cada uma apresenta uma função biológica específica (BORRACINI, 2006).

As proteínas são compostas por longas cadeias de aminoácidos ligadas com um grupo amina através de ligações peptídicas. Este grupo amina possui um nitrogênio carregado positivamente em uma ponta e um grupo carboxila carregado negativamente na outra ponta. A cadeia é constituída por uma sequência de grupos laterais distintos que representam a cada um dos 20 aminoácidos (CAMPBELL, 2000).

As proteínas são classificadas de acordo com suas funções, composição, número de cadeias polipeptídicas e forma. Quanto à função existem dois grandes grupos, as proteínas dinâmicas e as proteínas estruturais. As proteínas dinâmicas são responsáveis pelo transporte de substâncias, controle do metabolismo, catálise de reações, dentre outras funções. As proteínas estruturais possuem como principal função a estruturação das células, dos tecidos do

corpo humano, um exemplo que pode ser citado desse tipo de proteína é o colágeno. Quanto à composição, as proteínas podem ser classificadas em proteínas simples e proteínas conjugadas. As proteínas simples são caracterizadas por liberarem somente aminoácidos durante a hidrólise, enquanto as proteínas conjugadas liberam aminoácidos e um radical não peptídico (grupo protético) durante a hidrólise. Quanto ao número de cadeias polipeptídicas, as proteínas são classificadas em proteínas monoméricas e proteínas oligoméricas. As proteínas monoméricas são compostas por uma única cadeia polipeptídica, já as proteínas oligoméricas são constituídas por mais de uma cadeia polipeptídica (MAGALHÃES, 2018).

A configuração espacial dos átomos de uma proteína ou de qualquer fragmento da proteína é denominada de conformação, sendo que as possíveis conformações de uma molécula de proteína ou de qualquer fragmento de uma proteína abrangem qualquer estado estrutural que ela tenha a possibilidade de assumir, sem que ocorra o rompimento de suas ligações covalentes. Uma alteração conformacional pode acontecer, por exemplo, através da rotação sobre as ligações simples. Dentre as múltiplas conformações teóricas possíveis para uma molécula protéica que apresenta centenas de ligações simples, poucas predominam em condições biológicas. A necessidade de múltiplas conformações estáveis retrata as alterações que devem acontecer na proteína quando a mesma se liga a outras moléculas ou atua como catalisador. As conformações existentes em determinadas condições são, geralmente, as termodinamicamente mais estáveis, ou seja, as que apresentam energia de Gibbs menores (NELSON; COX, 2014).

Como mencionado anteriormente, as moléculas protéicas possuem em seu estado natural uma conformação (configuração tridimensional), e de acordo com essa conformação as mesmas podem ser classificadas em globulares ou fibrosas (COÊLHO, 2012).

As proteínas fibrosas são compostas por cadeias polipeptídicas arranjadas em paralelo ao longo de um único eixo, constituindo longas fibras ou lâminas. Já as proteínas globulares são constituídas por cadeias polipeptídicas arranjadas de maneira esférica ou globular compacta (CHAMPE; HARVEY FERRIER, 2006).

As moléculas de uma mesma proteína que possuem conformação igual são denominadas nativas. Esta é a conformação mais linear que a molécula pode apresentar naquelas condições e representa um equilíbrio sensível entre as interações ocorridas na região interna da molécula protéica e entre esta e seu meio ambiente (CAMPESE, 2004).

4.3 Enzimas

Grande parte da história da bioquímica é a respeito da pesquisa sobre enzimas. O cientista francês Louis Pasteur determinou na década de 50, que a fermentação do açúcar em álcool realizado pela levedura é catalisada por fermentos, ele presumiu que esses fermentos, posteriormente denominados de enzimas, eram inseparáveis da estrutura celular das células presentes no levedo, teoria essa que permaneceu por vários anos. No ano de 1897, o químico alemão Eduard Buchner, constatou que extratos de levedo eram capazes de fermentar o açúcar até o álcool, certificando que as enzimas presentes na fermentação permaneciam em atividade mesmo quando retiradas da estrutura das células vivas. A partir daí, inúmeros estudos vêm sendo feitos na tentativa de se isolar as diversas enzimas existentes e na avaliação das propriedades catalíticas delas (CÉSAR, 2005).

Com a exceção de RNA's (ribozimas), todas as enzimas são proteínas que atuam como catalisadores. A função catalítica das enzimas se dá através da diminuição da energia livre de ativação, todavia, elas não alteram os aspectos termodinâmicos das reações (CAMPBELL, 2000).

O grande e altamente seletivo aumento de velocidade das reações promovido pelas enzimas pode ser explicado em duas partes. A primeira parte fundamenta-se no rearranjo das ligações covalentes enquanto a reação é catalisada pela enzima. Vários tipos de reações químicas acontecem entre o substrato e os grupos funcionais presentes na enzima. Grupos funcionais catalíticos presentes na enzima têm a possibilidade de formar ligações covalentes transitórias com um substrato, e acionar ele para a reação, ou um grupo pode ser transitoriamente movido do substrato para a enzima. Normalmente, essas reações acontecem somente no sítio ativo (local que proporciona um ambiente específico adequado para que uma determinada reação ocorra de maneira mais rápida) da enzima. Interações covalentes da enzima com o substrato reduzem a energia de ativação, aumentando a velocidade da reação, por darem condições para que a reação aconteça através de uma via alternativa de baixa energia (NELSON; COX, 2014).

A segunda parte baseia-se em interações não covalentes da enzima com o substrato, lembrando que interações fracas não covalentes auxiliam na estabilização da estrutura das proteínas e as interações proteína-proteína. Essas mesmas interações são essenciais para a constituição de complexos entre proteínas e moléculas pequenas, incluindo os substratos de enzimas. Grande parte da energia necessária para reduzir a energia de ativação se deriva das interações fracas não covalentes do substrato com a enzima. Mas o fato que realmente

diferencia as enzimas de outros catalisadores é que quando se utiliza enzimas, há a formação de um complexo enzima-substrato específico. A interação do substrato com a enzima nesse complexo é conduzida pelas mesmas forças que atuam na estabilização da estrutura das moléculas de proteína, incluindo interações hidrofóbicas e iônicas e ligações de hidrogênio. Durante formação das interações fracas que ocorrem no complexo enzima-substrato, acontece a liberação de uma baixa quantidade de energia livre que estabiliza a interação. A energia resultante da interação enzima-substrato é chamada de energia de ligação, sendo que a energia de ligação será a principal fonte de energia livre empregada pelas enzimas para a redução da energia de ativação das reações (NELSON; COX, 2014).

Um dos benefícios de se utilizar enzimas como catalisadores é que nesses casos, raramente ocorrerá reações colaterais que acabam gerando desperdício da formação de subprodutos, o que se deve a alta especificidade das enzimas (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2008).

Como mencionado anteriormente, as enzimas possuem a capacidade de aumentar de maneira significativa a velocidade das reações químicas em sistemas biológicos, se equiparada com as mesmas reações, mas sem a presença das enzimas. Para que uma proteína seja classificada como uma enzima, ela deve apresentar as seguintes características, possuir elevado grau de especificidade em relação a seus substratos e seus produtos, aumentar a velocidade das reações em 10^6 a 10^{12} vezes mais que as mesmas reações, mas sem a presença o catalisador, não ser consumida ou modificada ao participar da catálise, não modificar o equilíbrio químico das reações, entre outras (LOPES, 2009).

As enzimas podem ser classificadas de acordo com o tipo de reação na qual ela irá atuar. A classificação ocorre da seguinte maneira, classe 1 (óxido-redutases), classe 2 (transferases), classe 3 (hidrolases), classe 4 (liases), classe 5 (isomerase), e classe 6 (ligase). As óxido-redutases atuam na transferência de elétrons (íons hídrico ou átomos de hidrogênio). As transferases têm como função catalisar reações de transferência de grupos. As hidrolases agem na catálise de reações de hidrólise (deslocamento de grupos funcionais para a água). As liases catalisam a clivagem de ligações químicas, através da eliminação, quebra de ligações duplas ou anéis, ou acréscimo de grupos a ligações duplas. As isomerasas atuam como catalisadores nas reações de transferência de grupos dentro de uma mesma molécula gerando configurações isoméricas. As ligases catalisam reações de formação de ligação entre carbono-carbono, carbono-enxofre, carbono-oxigênio, e carbono-nitrogênio através de reações de condensação acopladas à hidrólise de ATP ou cofatores similares (NELSON; COX, 2014).

Atualmente são poucas as enzimas das quais se tem um conhecimento detalhado sobre como elas propiciam a função catalítica, porém se sabe que os mecanismos catalíticos utilizados pelas enzimas são semelhantes aos mecanismos de catálise química (ANDRÉ; NOBRE, 2012).

Existem quatro tipos de catálise, que são a catálise covalente, a catálise ácida, a catálise básica e a catálise por coordenação ou por íon metálico. Na catálise ácida acontece a transferência parcial de um próton de um grupo ácido para o substrato, fazendo assim com que ocorra a redução da energia de ativação. Já na catálise básica, um grupo básico recebe um próton do substrato, elevando assim a velocidade da reação. Em alguns casos, a reação pode ser catalisada por uma catálise ácido-básica geral combinada (ANDRÉ; NOBRE, 2012). Na catálise covalente ocorre a formação de uma ligação covalente transitória entre a enzima e o substrato, que resulta no aumento da velocidade da reação (NELSON; COX, 2014). Na catálise por íon metálico, o íon metálico pode atuar de três maneiras como catalisador, deixando um centro de reação mais suscetível a ganhar elétrons, convertendo um grupo de saída em uma base mais fraca e, assim, em um melhor grupo de saída ou elevando a velocidade de uma reação de hidrólise através do aumento da nucleofilicidade da água (BARREIROS; BARREIROS, 2012).

A atividade enzimática é afetada por fatores químicos e físicos, como por exemplo, a temperatura, o pH, e o tempo. O controle de temperatura, por exemplo, é extremamente importante se tratando de atividade enzimática, pois temperaturas muito elevadas acabam provocando a desnaturação das enzimas, já temperaturas muito baixas acabam inibindo a atividade enzimática. Outro fator que influencia na atividade enzimática é o pH, em que pH's extremos na maioria dos casos, irão provocar a desnaturação das enzimas (ATIVIDADE ENZIMÁTICA, 2019).

A temperatura atua da seguinte forma sobre a enzima, dentro de certos limites, a elevação da temperatura tende a aumentar a velocidade da reação enzimática, isso ocorre, pois, a elevação da temperatura resulta na maior agitação das moléculas, fazendo com que ajam maiores possibilidades das moléculas se chocarem para reagir. Contudo, a partir de uma certa temperatura, a vibração das moléculas torna-se muito intensa, fazendo com que as ligações que estabilizam a estrutura espacial da enzima se quebrem, resultando na desnaturação da enzima (FATORES, 2020).

As enzimas possuem um pH ótimo de atuação, em que a atividade enzimática delas terá um maior desempenho. O pH ótimo pode ser entendido da seguinte forma, as enzimas

apresentam grupos ionizáveis nas cadeias laterais de seus aminoácidos, estes grupos podem possuir cargas elétricas positivas, negativas ou neutras, de acordo com o pH do meio. Uma vez que, a conformação das proteínas está relacionada, em parte, com suas cargas elétricas, existirá um pH em que a conformação será a mais apropriada para a atividade catalítica, sendo esse denominado de pH ótimo (KIELING, 2002).

O pH pode influenciar a atividade enzimática de diversas maneiras, como por exemplo, alterações nele podem causar mudanças nos grupos ionizados dos aminoácidos presentes nos sítios ativos das enzimas, afetar o substrato, entre outros (KIELING, 2002). As variações no pH podem ainda ocasionar a desnaturação da enzima, podendo a desnaturação ser ácida (desaparecimento das cargas negativas) ou alcalina (desaparecimento das cargas positivas) (COELHO, 2019).

O tempo também deve ser levado em consideração quando o assunto é atividade enzimática, pois quanto maior o tempo em que a enzima ficar em contato com o substrato, maior será a quantidade de produto obtido (enquanto houver substrato) (FEY, 2016).

4.3.1 Proteases

As enzimas proteolíticas, também chamadas de proteases, são caracterizadas por catalisarem a quebra das ligações peptídicas entre os aminoácidos das cadeias protéicas (DE LIMA, *et al.*, 2007).

As proteases são classificadas como um subgrupo das hidrolases, sendo a sua nomenclatura realizada de acordo com a natureza química do sítio catalítico, com o tipo de reação catalisada, e com a estrutura da protease (TREMACOLDI, 2009).

Grande parte das enzimas proteolíticas acaba por não hidrolisar moléculas de proteínas em qualquer ligação peptídica, devido a sua especificidade, sendo essas capazes de hidrolisar apenas ligações entre certos aminoácidos específicos. No entanto, há algumas enzimas proteolíticas que não possuem especificidade em relação a sua composição dos aminoácidos, possuindo assim, a capacidade de hidrolisar a proteína em fragmentos menores. As enzimas proteolíticas abrangem dois grupos, as endopeptidases (ou proteinases), e as exopeptidases. As endopeptidases rompem ligações peptídicas no interior da cadeia protéica, já as exopeptidases tem a ação direcionada aos aminoácidos terminais da cadeia polipeptídica (VIEIRA, 2013).

As enzimas proteolíticas podem ser classificadas de acordo com a natureza química do sítio ativo, sendo elas classificadas em serina proteases, cisteína proteases, aspártico proteases, treonina protease e metaloproteases (INFINITY PHARMA, 2019).

As enzimas proteolíticas podem estar presentes em vegetais e animais. Nos vegetais, as proteases estão atreladas aos processos de germinação, de amadurecimento, de resposta de defesa de plantas a estresse oxidativo etc (LIMA *et al.*, 2007). Nos animais, as enzimas proteolíticas desempenham uma ampla variedade de funções fisiológicas, por exemplo, conduzir funções metabólicas e regulatórias, atuar no catabolismo de proteínas, na formação de tecidos, na coagulação sanguínea, entre outras (TREMACOLDI, 2009).

As proteases apresentam alto valor comercial, sendo elas bastantes empregadas nas indústrias de biotecnologia. No setor alimentício, as enzimas proteolíticas são empregadas em processos fermentativos, na fabricação de alimentos orientais, gelatina hidrolisada, na clarificação de sucos por meio da hidrólise das proteínas solúveis. Na produção cervejeira, elas são utilizadas para hidrolisar as proteínas que causam a turvação da bebida. Já na indústria de panificação, as proteases são empregadas na fabricação da massa macia (através da hidrólise do glúten). As enzimas proteolíticas também podem ser usadas nos processos de tenderização (processo de amaciamento através da degradação das fibras musculares) e condicionamento de carnes (GODOI, 2007). Elas ainda podem ser empregadas na substituição de compostos tóxicos e poluentes empregados em curtumes para o tratamento do couro (COELHO, 2012).

4.4 Bromelina

A bromelina é um conjunto de enzimas proteolíticas presente em todos vegetais da família *Bromeliaceae*, em que o abacaxi possui maior relevância econômica (ZANETTE *et al.*, 2017), sendo ela classificada como uma glicoproteína, ou seja, ela possui um resíduo oligossacarídeo por molécula, que está ligada a cadeia peptídica por uma ligação covalente (BARROS, 2009).

Das várias partes do abacaxizeiro que podem ser utilizadas como fontes para a obtenção da bromelina, as matérias-primas mais empregadas são os caules das plantas, pois nesta parte se encontram os maiores níveis da enzima (PEDREIRA, 2001).

Como citado anteriormente, a bromelina está presente em todo o abacaxizeiro, porém a denominação da bromelina varia de acordo com o local do abacaxi que ela se encontra. Por

exemplo, a bromelina extraída do caule é denominada de bromelina do caule (EC 3.4.22.32), já a bromelina extraída da fruta é denominada de bromelina da fruta (EC 3.4.22.33) (BABU; RASTOGI; RAGHAVARAO, 2008).

A bromelina presente no caule apresenta maior importância no ponto de vista industrial, pois esta demonstra atividade em uma grande faixa de pH, sendo ela classificada como cisteína proteases. A bromelina presente na fruta é classificada como glucoproteína proteases, que encontram-se no suco do abacaxi (CORSO; WALISZEWSKI; WELTI-CHANES, 2012; BERNELA; AHUJA; THAKUR, 2016 apud ABREU, 2019).

A estrutura da bromelina do caule é formada por apenas uma cadeia de polipeptídios, apresentado 212 aminoácidos dobrados em duas estruturas domínios estabilizados através de pontes de dissulfeto e várias ligações de hidrogênio (SOARES, 2012).

Mesmo a bromelina estando presente em todo o abacaxizeiro (CRESTANI *et al.*, 2010), isso não significa que a enzima de diferentes partes do abacaxi possuem a mesma atividade proteolítica. Segundo FRANÇA-SANTOS *et al.* (2009), para se alcançar a máxima atividade proteolítica da bromelina presente no abacaxi, o pH tem que ser levemente ácido, por volta de 5,0 no tampão acetato de sódio, e a temperatura por volta de 40°C. Porém, outro estudo aponta que a máxima atividade proteolítica da bromelina presente no abacaxi pode ser obtida nos pHs de 8,5 e 7,2, e na temperatura de 50°C (SILVA, 2008). Já no caso da bromelina presente no caule do abacaxi, a máxima atividade pode ser atingida em pH 7,0, a 60°C de temperatura (ROWAN; BUTTLE; BARRET, 1990 apud FRANÇA-SANTOS *et al.*, 2009).

Os níveis de bromelina no abacaxizeiro dependem do estágio de crescimento da planta, sendo que no período inicial ou muito avançado da planta, a enzima não é praticamente encontrada (PEDREIRA, 2001). Nestes períodos, acredita-se que a bromelina é modificada em uma outra proteína, que possui uma função metabólica diferente (BALDINI *et al.*, 1993 apud PEDREIRA, 2001).

A bromelina apresenta diversos benefícios para a saúde do ser humano, como por exemplo, melhora na circulação (auxilia a desobstruir a circulação), ação mucolítica, ação anti-inflamatória, (TEIXEIRA, 2010), ação digestiva (auxilia no desdobramento de proteínas alimentares no estômago), o que permite um melhor aproveitamento das proteínas presentes nos alimentos pelo organismo (USOS, 2015).

Além dos benefícios para a saúde humana, a bromelina possui aplicações em diversos outros setores, como por exemplo, no setor têxtil, ela pode ser usada no tratamento

da seda e da lã, já na indústria alimentícia, a mesma pode ser empregada para o amaciamento de carnes, fabricação de queijos, no pré-tratamento de soja, entre outros (BORRACINI, 2006).

4.5 Processos de Extração de Enzimas

As enzimas são produzidas, a princípio, na parte interna das células, porém algumas delas são excretadas para o meio externo, sendo essas classificadas como extracelulares ou exoenzima. Já as enzimas que permanecem no interior das células são denominadas de intracelular ou endoenzima. Portanto para se obter as exoenzimas não é necessário empregar técnicas para realizar o rompimento da parede celular (COURI; DAMASO, [s. d.]), enquanto que, para as endoenzimas, como é o caso da bromelina, é preciso romper a parede celular para se conseguir a enzima (ZANETTE *et al.*, 2017).

Para haver a completa destruição da parede celular e conseqüentemente a liberação do produto intracelular, é necessário que ocorra a desnaturação dos constituintes desta estrutura, para se eliminar a resistência de contato (MACHADO JR., 2014).

Os métodos existentes para promover o rompimento da parede celular são os mecânicos, baseados em força de cisalhamento ou por pressão, e os não mecânicos, baseados em princípios físicos, químicos e enzimáticos. Dentre os métodos não mecânicos pode-se citar como exemplo, extrações com detergentes, com *lise* enzimática. Dentre os métodos mecânicos pode-se citar a extração por homogeneizador a alta pressão, por ultrassom (HARRISON, 1991; HO *et al.*, 2006 apud DE SÁ LEITÃO, 2017) que é o foco deste estudo.

No processo de extração de enzimas o objetivo é determinar a atividade enzimática e não a massa de enzima extraída, pois uma solução que possui enzimas desnaturadas conserva a massa protéica, mas perde a capacidade catalítica (COELHO, 2012).

4.6 Ultrassom

Os primórdios do ultrassom se deram na parte final o século XIX, mais especificamente no ano de 1877, quando cientista inglês John William Strutt, também conhecido como Lorde Rayleigh, publicou a "Teoria do Som", sendo que este tratado, praticamente iniciou a física acústica moderna. Por volta de 1880, os irmãos Pierre Curie e Jacques Curie descobriram o efeito piezelétrico, sendo este fato considerado por grande parte

dos pesquisadores como o momento no qual o ultrassom foi concebido (TACON; SANTOS; AMARAL, 2012).

Durante o período da primeira guerra mundial (1914-1918), o ultrassom foi empregado para a detecção de *icebergs* e submarinos inimigos. Já na segunda guerra mundial (1939-1945), o ultrassom foi empregado no desenvolvimento do SONAR (*Sound Navigation and Ranging*) (TACON; SANTOS; AMARAL, 2012). A partir daí, o ultrassom foi sendo estudado e aprimorado, chegando até os dias atuais.

As ondas sonoras situadas na faixa de 20 a 20.000 Hz são audíveis para os seres humanos, acima dessa faixa (>20.000 Hz), se tem as ondas que são classificadas como ultrassônicas, sendo essas inaudíveis para os seres humanos (PÉCORÁ; GUERISOLI, 2004).

As ondas ultrassônicas podem ser classificadas de acordo com a sua frequência e intensidade. As ondas de baixa energia possuem uma alta frequência, de 2 a 20 MHz, e uma baixa intensidade ($<1 \text{ W.cm}^{-2}$) (O'DONNELL *et al.*, 2010 apud DALAGNOL, 2017), já as ondas de alta energia possuem uma baixa frequência, de 20 a 100 kHz, e uma alta intensidade ($10 - 1000 \text{ W.cm}^{-2}$) (MASON *et al.*, 2005 apud DALAGNOL, 2017).

A utilização do ultrassom de baixa intensidade tem como objetivo transmitir a energia através de um meio, afim de se obter informações sobre o mesmo. Já o emprego do ultrassom de alta intensidade tem como finalidade promover mudanças no meio através do qual a onda se propaga (PÉCORÁ; GUERISOLI, 2004).

Por se tratar de ondas mecânicas, as ondas ultrassônicas necessitam de um meio, seja ele sólido, líquido ou gasoso, para que elas possam se propagar (RIBEIRO, 2015). As ondas sonoras em geral são produzidas quando os constituintes de um meio recebem energia e começam a oscilar sua posição, nesta ocasião, as partículas que compõe o meio transmitem parte desta energia na forma de onda, gerando o fenômeno de vibração (WILLIAMS, 1983 apud PEDRO, 2008).

A técnica de extração com o uso do ultrassom emprega a energia de ondas ultrassônicas, as quais geram vibrações que promovem uma variação na pressão no líquido gerando a cavitação (formação e implosão de microbolhas de gás no centro de um líquido) (DA LUZ, 1998). As bolhas de cavitação variando de maneira estável geram uma espécie de campo, em que acontece o aumento de massa e por consequência a transferência de calor para o meio, formando um gradiente de velocidade, e criando uma força capaz de promover o rompimento celular (NEVES, 2003).

O fenômeno da cavitação ocorre quando as ondas ultrasônicas se propagam no meio físico, gerando ciclos alternativos de alta pressão (compressão) e baixa pressão (ráfagas). Durante o ciclo de baixa pressão, as ondas ultrasônicas de alta intensidade geram pequenas bolhas de vácuo. Quando as bolhas chegam a um volume em que elas não conseguem mais absorver energia, elas se colapsam violentamente durante um ciclo de alta pressão, gerando a força de cisalhamento, sendo esse fenômeno conhecido como cavitação. Neste processo de implosão, temperaturas e pressões elevadas podem ser alcançadas no local (EXTRAÇÃO... 2020). Vale ressaltar que a cavitação obtida com as ondas ultrasônicas é a cavitação acústica, em que as variações de pressão no líquido são obtidas através de ondas sonoras som, geralmente o ultrassom. Além da cavitação acústica existe também a cavitação hidrodinâmica (gerada pela oscilação de pressão que é alcançada utilizando a geometria do sistema gerando variação de velocidade, como no caso de escoamento por meio de orifícios e venturis), cavitação óptica (gerada por fótons de luz de alta intensidade rompendo a continuidade do líquido), cavitação de partículas (obtida através de um feixe de partículas elementares) (GOGATE; PANDIT, 2005).

Na figura a seguir, está apresentado um sonicador de ponteira, sendo este semelhante ao equipamento utilizado para a realização das extrações neste estudo.

Figura 2. Sonicador de ponteira



Fonte: SONICADOR, 2018

As ondas ultrasônicas são produzidas através dos transdutores, dispositivos que transformam um tipo de energia em outro tipo de energia. Um exemplo rotineiro de transdutor

é o auto-falante que transforma a energia eletromagnética em som (energia mecânica) (PEDRO, 2008).

Os transdutores ultrassônicos empregam a deformação de materiais piezelétricos para produzir a energia sônica (MORAIS *et al.*, 2017). O efeito piezelétrico nada mais é do que a propriedade que alguns materiais, como por exemplo, titanato de bário, quartzo, entre outros, possuem quando a utilização de uma voltagem nos eletrodos de sua superfície gera uma deformação mecânica em uma certa direção (BISCEGLI, 2003). No caso dos sonicadores de ponteira, a energia elétrica é transmitida por meio dos transdutores piezelétricos presentes no interior do conversor, onde ocorre a transformação da energia elétrica em energia mecânica vibratória, por causa da expansão e contração dos transdutores, sendo esta vibração intensificada pela sonda (ponteira), que fica em contato com a amostra, que será responsável por gerar o fenômeno da cavitação (PROCESSADOR... 2019).

A extração de enzimas utilizando o ultrassom trás como vantagem, a utilização de um menor volume de reagentes químicos ou em alguns casos a não utilização destes, o que resulta na diminuição ou eliminação na geração de resíduos que necessitam de maiores cuidados quanto ao descarte. De modo geral, a extração por ultrassom consome menos tempo se comparada aos métodos tradicionais (CHEMAT *et al.*, 2011 apud CAVALHEIRO, 2013).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Matéria-prima

Para a realização do experimento utilizou-se caules de abacaxizeiros, *Ananas comosus* (L.) Merrill, fornecidos pelo Instituto Agrônômico do Paraná - IAPAR e cultivados na fazenda experimental de Santa Helena – PR. Os caules foram limpos, fracionados com o auxílio de um processador de alimentos, embalados a vácuo e congelados.

5.2 Obtenção do Extrato Bruto

As amostras de caule foram descongeladas em temperatura ambiente, submetidas duas vezes, em sequência, a um processador de frutas centrífugo, e posteriormente pesadas.

Foram pesadas 18 amostras de 40 g de caule cada, sendo 11 amostras empregadas na extração de enzimas com o auxílio das ondas ultrassônicas e 7 amostras utilizadas para a obtenção do extrato sem o auxílio de ultrassom. Posteriormente, foram acrescentados 100 mL de água destilada em todas as amostras, respeitando a proporção de 1:2,5 (m/v) de tecido vegetal/água, mantendo-se o volume das mesmas constante.

Os experimentos utilizando ondas ultrassônicas foram executados conforme o planejamento fatorial 2^3 , de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2. Fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial 2^3 com triplicata no ponto central, para a extração com auxílio de ultrassom

Fatores	Níveis		
	-1	0	1
Temperatura banho (°C)	9	17	25
Potência equipamento (%)	20	50	90
Tempo (min)	1	5	9

No caso das amostras que não foram submetidas ao sonicador de ponteira, os ensaios foram realizados de acordo com o planejamento fatorial 2^2 , conforme a Tabela 3.

Tabela 3. Fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central, para a extração sem auxílio de ultrassom

Fatores	Níveis		
	-1	0	1
Temperatura banho (°C)	9	17	25
Tempo (min)	1	5	9

Após cada amostra ser submetida às condições experimentais estabelecidas, transferiu-se alíquotas de 2,0 mL de extrato bruto de bromelina para microtubos, e armazenou-os em refrigerador, para posteriores análises.

5.3 Determinação do Conteúdo de Proteínas

A metodologia utilizada para a determinação do conteúdo de proteínas foi o teste de Bradford (BRADFORD, 1976).

Este método determina o conteúdo de proteína utilizando a formação de um complexo entre a proteína e o corante *Coomassie Brilliant Blue G-250*, que absorve fortemente no comprimento de onda de 595 nm. Para se mensurar a concentração de proteína presente em cada amostra, utilizou-se a equação da reta de uma curva de calibração construída a partir de uma solução padrão de albumina na concentração de 1 mg mL⁻¹.

5.4 Determinação da Atividade Enzimática

A metodologia utilizada na determinação da atividade proteolítica é uma adaptação das metodologias utilizadas por IADEROZA (1991), KUNITZ (1947) e MOURA (2010).

Esta técnica toma como base a determinação da atividade proteolítica por meio da hidrólise enzimática da caseína a 1,2% (p/v) pH 6,0 a 37°C por um período de 10 minutos, acompanhado da precipitação do substrato não hidrolisado com uma solução de ácido tricloroacético (TCA).

A quantidade de produtos hidrolíticos não precipitados (peptídeos solúveis em TCA) é mensurada com o auxílio de um espectrofotômetro, sendo feita a leitura em um comprimento de onda de 280 nm, contra um branco. A atividade proteolítica é determinada empregando uma curva de calibração com soluções padrões em diferentes concentrações de tirosina.

5.5 Determinação da Atividade Específica

A determinação da atividade específica foi realizada através da relação entre a atividade enzimática e o conteúdo de proteína, conforme a equação a seguir.

$$A_{es} = A_{ez} / C_{pt}$$

Onde Aes é a atividade específica em U mg^{-1} , Aez é a atividade enzimática em U mL^{-1} e Cpt é o conteúdo de proteína em mg mL^{-1} .

5.6 Tratamento estatístico

O tratamento estatístico dos dados foi realizado por meio do software matemático *Microsoft Excel* 2019 64 bits.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 4 estão dispostos os resultados para o conteúdo de proteína, para a atividade enzimática, parâmetro utilizado para avaliar a atividade catalítica da enzima, e para a atividade específica, parâmetro empregado para determinar o grau de pureza da enzima, obtidos através da análise do extrato bruto de bromelina extraído sem o auxílio das ondas ultrassônicas.

Tabela 4. Resultados de conteúdo de proteína, atividade enzimática, e atividade específica sem ultrassom

Amostra	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Conteúdo de Proteína (mg mL ⁻¹)	Atividade Enzimática (U mL ⁻¹)	Atividade Específica (U mg ⁻¹)
B1	9	1	0,3466	0,1460	0,4212
B2	9	9	0,3044	0,3719	1,2221
B3	25	1	0,1349	0,0000	0,0000
B4	25	9	0,3250	0,4545	1,4000
B5	17	5	0,2220	0,0220	0,0991
B6	17	5	0,2237	0,0000	0,0000
B7	17	5	0,2284	0,0000	0,0000

Ao analisar os resultados das amostras que não foram submetidas ao processo de extração com sonificador de ponteira, dispostos na Tabela 4, verificou-se que no caso dos experimentos B3, B6 e B7, a atividade enzimática permaneceu zerada, concluiu-se também, através da verificação dos resultados, que as condições empregadas na amostra B4 trazem os valores mais satisfatórios para a concentração de proteína, para a atividade enzimática e para a atividade específica, quando se tratou do processo de obtenção de extrato sem auxílio de ultrassom.

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados obtidos através da análise do extrato bruto de bromelina extraídos, desta vez, com o auxílio das ondas ultrassônicas, para o conteúdo de proteína, para a atividade enzimática, e para a atividade específica, obtidos por meio da análise do extrato bruto de bromelina extraído com o auxílio do sonificador de ponteira.

Ao se analisar os resultados, para o conteúdo de proteína, para a atividade enzimática, e para a atividade específica, disponíveis na Tabela 5, notaram-se variações entre os valores das amostras, para avaliar se estas oscilações são estatisticamente significativas ou não estatisticamente significativa, os dados foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA).

Tabela 5. Resultados de conteúdo de proteína, atividade enzimática, e atividade específica com ultrassom

Amostra	Temperatura (°C)	Potência (%)	Tempo (min)	Conteúdo de Proteína (mg mL ⁻¹)	Atividade Enzimática (U mL ⁻¹)	Atividade Específica (U mg ⁻¹)
1	9	20	1	0,1585	0,2617	1,6530
2	9	90	1	0,2364	0,3416	1,4467
3	9	20	9	0,3050	0,6171	2,0230
4	9	90	9	0,3610	0,9284	2,5706
5	25	20	1	0,2697	1,3140	4,8721
6	25	90	1	0,2556	0,9284	3,6307
7	25	20	9	0,3644	1,6226	4,4539
8	25	90	9	0,2500	0,9449	3,7800
9	17	50	5	0,1909	0,6584	3,4468
10	17	50	5	0,2120	0,8760	4,1321
11	17	50	5	0,2581	0,9229	3,5761

A Tabela 6 traz o resultado da análise de variância para os valores do conteúdo de proteína das amostras que foram submetidas ao processo de extração com auxílio das ondas ultrassônicas, para tal análise, empregou-se um valor de 0,05 (5%) para o nível de significância (α).

Tabela 6. Análise de Variância - Conteúdo de Proteína

Fonte da variação	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,123893	10	0,012389	38,51352	1,28E-11	2,296696
Dentro dos grupos	0,007077	22	0,000322			
Total	0,13097	32				

Ao analisar os dados da análise de variância presentes na Tabela 6, constatou-se a existência de diferença estatisticamente significativa entre os resultados do conteúdo de proteína das amostras, pois observou-se que o valor-p é inferior ao valor do nível de significância (0,05) utilizado na análise de variância, com isso, realizou-se o teste de Tukey com nível de confiança de 95%, sendo tal teste responsável por apontar entre quais amostras existe diferença estatisticamente significativa. O resultado do teste de Tukey com nível de confiança de 95% realizado para os valores do conteúdo de proteína está apresentado na Tabela 7, na página a seguir.

Ao avaliar os valores da Tabela 5, verificou-se que os resultados das amostras 4 e 7 foram os mais satisfatórios, quando se trata do conteúdo de proteína. Através da análise do teste de Tukey com nível de confiança de 95% disposto na Tabela 7, constatou-se que a diferença da concentração de proteína das amostras 4 e 7 em relação as demais amostras é

estatisticamente significativa, porém a variação entre os valores de tais amostras não apresentou significância estatística, também se observou que o tempo de extração foi o fator que atuou de maneira positiva na obtenção do conteúdo de proteína, em que 9 minutos, de maneira geral, trouxe os melhores resultados.

Tabela 7. Teste de Tukey com nível de confiança de 95% - Conteúdo de Proteína

Amostra	Temperatura (°C)	Potência (%)	Tempo (min)	Conteúdo de Proteína (mg mL ⁻¹)	Teste de Tukey ¹
1	9	20	1	0,1585 a	I
2	9	90	1	0,2364 b	E F H I J K
3	9	20	9	0,3050 c	E F K
4	9	90	9	0,3610 d	G
5	25	20	1	0,2697 e	B C F H K
6	25	90	1	0,2556 f	B C E H J K
7	25	20	9	0,3644 g	D
8	25	90	9	0,2500 h	B E F J K
9	17	50	5	0,1909 i	A B J
10	17	50	5	0,2120 j	B F H I K
11	17	50	5	0,2581 k	B C E F H J

¹ Letras minúsculas e maiúsculas iguais significam a não existência de diferença significativa entre os valores, de acordo com o teste de Tukey com nível de confiança de 95%.

O mesmo procedimento foi realizado para os resultados da atividade enzimática e da atividade específica das amostras.

A Tabela 8 apresenta o resultado da análise de variância para os valores da atividade enzimática das amostras que foram submetidas ao processo de extração com auxílio de ultrassom, para esta análise, adotou-se 0,05 (5%) para o nível de significância.

Tabela 8. Análise de Variância - Atividade Enzimática

Fonte da variação	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	4,604007	10	0,460401	96,31483	8,66E-16	2,296696
Dentro dos grupos	0,105164	22	0,00478			
Total	4,709171	32				

Ao analisar os dados da análise de variância expostos na Tabela 8, notou-se que neste caso também há diferença significativa entre os resultados, pois como no caso do conteúdo de proteína, o valor-p é menor que o valor do nível de significância (0,05) adotado. Para se descobrir entre quais amostras existe diferença significativa, foi realizado o teste de Tukey com nível de confiança de 95% para os valores da atividade enzimática, onde o resultado para tal teste está apresentado na Tabela 9.

Tabela 9. Teste de Tukey com nível de confiança de 95% - Atividade Enzimática

Amostra	Temperatura (°C)	Potência (%)	Tempo (min)	Atividade Enzimática (U mL ⁻¹)	Teste de Tukey ¹			
1	9	20	1	0,2617 a	B			
2	9	90	1	0,3416 b	A			
3	9	20	9	0,6171 c	I			
4	9	90	9	0,9284 d	F	H	J	K
5	25	20	1	1,3140 e				
6	25	90	1	0,9284 f	D	H	J	K
7	25	20	9	1,6226 g				
8	25	90	9	0,9449 h	D	F	J	K
9	17	50	5	0,6584 i	C			
10	17	50	5	0,8760 j	D	F	H	K
11	17	50	5	0,9229 k	D	F	H	J

¹ Letras minúsculas e maiúsculas iguais significam a não existência de diferença significativa entre os valores, de acordo com o teste de Tukey com nível de confiança de 95%.

Ao analisar os resultados da Tabela 5, constatou-se que os valores das amostras 5 e 7 foram os mais elevados, quando se trata da atividade enzimática. Através da análise do teste de Tukey com nível de confiança de 95% disposto na Tabela 9, verificou-se que a diferença da atividade enzimática das amostras 5 e 7 em relação as demais amostras é estatisticamente significativa, porém neste caso, a variação entre os valores de tais amostras também é estatisticamente significativa, além disso, notou-se que o aumento do tempo de sonicação e da temperatura, trouxe uma melhora nos resultados, assim como a redução da potência do equipamento, para a atividade enzimática.

A Tabela 10 dispõe o resultado da análise de variância para os valores da atividade específica das amostras que passaram pela extração com ondas ultrassônicas, para tal análise, empregou-se o valor de 0,05 (5%) para o nível de significância (α).

Tabela 10. Análise de Variância - Atividade Específica

Fonte da variação	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	39,30429	10	3,930429	46,26469	1,94E-12	2,296696
Dentro dos grupos	1,869016	22	0,084955			
Total	41,1733	32				

Ao avaliar os dados da análise de variância presentes na Tabela 10, constatou-se a existência de diferença significativa entre os valores da atividade específica, visto que, o valor-p é inferior ao valor do nível de significância (0,05) empregado, desta forma, realizou-se o teste de Tukey com nível de confiança de 95%, sendo este responsável por indicar entre

quais amostras existe diferença significativa. O resultado do teste de Tukey para os valores da atividade específica está disposto na Tabela 11.

Tabela 11. Teste de Tukey com nível de confiança de 95% – Atividade Específica

Amostra	Temperatura (°C)	Potência (%)	Tempo (min)	Atividade Específica (U mg ⁻¹)	Teste de Tukey ¹	
1	9	20	1	1,6530 a	B	C
2	9	90	1	1,4467 b	A	C
3	9	20	9	2,0230 c	A	B D
4	9	90	9	2,5706 d	C	
5	25	20	1	4,8721 e		G J
6	25	90	1	3,6307 f		G H I J K
7	25	20	9	4,4539 g	E	F H J
8	25	90	9	3,7800 h	F	G I J K
9	17	50	5	3,4468 i	F	H J K
10	17	50	5	4,1321 j	E	F G H I K
11	17	50	5	3,5761 k	F	H I J

¹ Letras minúsculas e maiúsculas iguais significam a não existência de diferença significativa entre os valores, de acordo com o teste de Tukey com nível de confiança de 95%.

Ao avaliar os valores da Tabela 5, verificou-se que os resultados das amostras 5 e 7 apresentaram os valores mais elevados, quando se trata da atividade específica. Através da análise do teste de Tukey com nível de confiança de 95% disposto na Tabela 11, constatou-se que a diferença entre a atividade específica de tais amostras não apresentou significância estatística.

As amostras 1 e 2 foram submetidas as mesmas condições de temperatura (9°C) e tempo de extração (1 min), diferindo apenas a potência do ultrassom de 20% para a primeira e 90% para a segunda. Os resultados obtidos para a atividade enzimática das amostras foram relativamente semelhantes, assim como os valores da atividade específica, já para o conteúdo de proteína a diferença entre os valores das amostras foi mais acentuada.

As amostras 3 e 4 também passaram pela mesma condição de temperatura (9°C), mas agora com o tempo de extração de 9 minutos. A potência do sonicador de ponteira, diferiu-se de 20% na amostra 3 para 90% na amostra 4. Neste caso, notou-se uma variação significativa entre os valores do conteúdo de proteína e da atividade enzimática das amostras 3 e 4, já os valores da atividade específica foram relativamente parecidos, sendo a variação entre eles estatisticamente não significativa.

Ao comparar os resultados das amostras 1 e 2 com os resultados das amostras 3 e 4, verificou-se que a elevação do tempo de extração de 1 para 9 minutos, nesta situação, resultou em uma melhora significativa nos resultados de ambos os casos, com exceção da atividade

específica entre as amostras 1 e 3, em que a melhora não foi considerada estatisticamente significativa.

As amostras 5 e 6 foram submetidas a 25°C de temperatura, sendo empregada uma potência de 20% para a 5 e 90% para a 6. Para ambas as amostras empregaram-se o tempo de extração de 1 minuto. Os valores obtidos para o conteúdo de proteína destas amostras foram relativamente parecidos, já para a atividade enzimática e para a atividade específica, ao analisar os resultados, verificou-se uma diferença mais atenuada entre as amostras, sendo esta estatisticamente significativa.

Assim como nas amostras 5 e 6, nas amostras 7 e 8 empregaram-se as mesmas condições de temperatura e potência, porém neste caso houve o aumento do tempo de extração de 1 para 9 minutos. Neste caso, verificou-se uma variação significativa entre os resultados do conteúdo de proteína e da atividade enzimática das amostras 7 e 8, já para a atividade específica, a variação entre os valores não foi considerada estatisticamente significativa.

Ao comparar os resultados das amostras 5 e 6 com os resultados das amostras 7 e 8, notou-se que o aumento do tempo de extração de 1 para 9 minutos, neste caso, trouxe uma melhora significativa somente para os resultados da amostra 7, com exceção da atividade específica.

Por último, as amostras 9, 10, e 11 foram submetidas a 17°C de temperatura, 50% de potência do equipamento, e 5 minutos de tempo de extração. Os resultados obtidos para estas amostras não apresentaram nem os melhores, e nem os piores valores para o conteúdo de proteína, para a atividade enzimática, e para a atividade específica.

Após a análise dos resultados, notou-se que a amostra 7 possui os melhores resultados para o conteúdo de proteína, ou seja, maior concentração de proteína, chegando a 0,3644 mg mL⁻¹, sendo este resultado 1,1 vezes maior, quando comparado com a amostra referente sem o uso do ultrassom, e para a atividade enzimática, chegando a 1,6226 U mL⁻¹, sendo este valor 3,6 vezes maior, quando comparado com a amostra que não foi submetida ao sonicador de ponteira, sendo as suas condições consideradas ideais para o processo. Além disso, como visto anteriormente, a amostra 7, juntamente com o a amostra 5, obteve os valores mais elevados para a atividade específica, parâmetro esse utilizado para determinar o grau de pureza de uma enzima, em que quanto mais alto é tal parâmetro, maior é a pureza da enzima, sendo 4,8721 U mg⁻¹ para o experimento 5 e 4,4539 U mg⁻¹ para o experimento 7, sendo a diferença entre tais valores considerada estatisticamente não significativa, concluindo

assim que as condições experimentais aplicadas na amostra 7 ainda são as ideais para o processo de extração com sonicador de ponteira, pois tanto o conteúdo de proteína, quanto a atividade enzimática da amostra 7 são estatisticamente superiores a da amostra 5, e mesmo a atividade específica do experimento 7 sendo inferior à do experimento 5, esta diferença não é significativa, o que não justifica o emprego das condições experimentais da amostra 5.

Com isso, percebeu-se que o uso de uma condição mais amena para a potência do sonicador (20%), temperatura de 25°C, e tempo de sonicação de 9 minutos são as melhores para realizar a extração com auxílio de ultrassom, pois além destas condições trazerem os melhores resultados, com exceção do tempo de sonicação, essas são as que representam menores custos operacionais. Isso também foi verificado no estudo realizado por ZANETTE *et. al.* (2017), em que o emprego de condições mais amenas de temperatura (25°C) e potência do equipamento (22%) trouxeram os melhores resultados práticos.

No caso do tempo de extração, o emprego de 9 minutos trouxe melhores resultados, pois um maior tempo de extração possibilita que uma maior quantidade de enzima seja extraída do tecido vegetal. O mesmo aconteceu no trabalho desenvolvido por ANJOS (2019), em que mesmo não se tratando da extração de uma enzima, foi verificado que o aumento do tempo de sonicação traz um certo aumento na eficiência da extração por ultrassom.

O emprego de 25°C de temperatura no processo de extração trouxe melhores resultados na obtenção do extrato bruto de bromelina, isso pode ter ocorrido, pois a temperatura do meio influencia na velocidade de propagação das ondas sonoras, em que temperaturas mais elevadas tornam a propagação das ondas mais rápidas no meio (GOUVEIA, 2021), sendo assim, dentre as temperaturas empregadas nas amostras neste estudo, a temperatura de 25°C é a mais elevada, onde o seu emprego traz uma maior velocidade de propagação das ondas ultrassônicas na amostra. Outro fator afetado pela temperatura é o fenômeno da cavitação, em que a elevação da mesma reduz a quantidade de energia necessária para gerar a cavitação (MASON; LORIMER, 2002 apud CHITARRA, 2013), então no caso das amostras em que empregou-se a temperatura de 25°C, a cavitação foi gerada de maneira mais fácil do que nas amostras em que empregou-se as demais temperaturas utilizadas neste estudo, o que pode ter resultado no melhor rendimento. O emprego de maiores temperaturas também resultou em uma melhora no processo de extração por ultrassom no estudo realizado por ANJOS (2019).

No caso da potência do sonicador, o uso de 90% de potência trouxe um aumento nos resultados quando se trabalhou com 9°C, sendo esta temperatura não considerada ideal para a

extração, porém quando se utilizou 25°C, o emprego de 90% não trouxe os melhores resultados para o processo, isso pode ter ocorrido, pois a combinação de uma maior temperatura (25°C) com uma potência do equipamento mais elevada (90%) pode ter causado uma inativação parcial da enzima, o que explicaria a queda nos resultados, neste caso, o uso de apenas 20% de potência resultou nos melhores valores para o processo.

Ao se comparar os resultados das amostras obtidas com e sem o auxílio de ultrassom, notaram-se variações nos valores, para verificar se estas oscilações são estatisticamente significativas, os dados foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA).

A Tabela 12 traz o resultado da análise de variância para os valores do conteúdo de proteína das amostras extraídas com, e sem o auxílio de ultrassom, para tal análise, empregou-se um valor de 0,05 (5%) para o nível de significância (α).

Tabela 12. Análise de Variância – Conteúdo de Proteína, amostras obtidas com e sem uso de ultrassom

Fonte da variação	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,223029	17	0,013119	57,8991	4,88E-21	1,915321
Dentro dos grupos	0,008157	36	0,000227			
Total	0,231186	53				

Ao analisar os dados da análise de variância expostos na Tabela 12, notou-se que neste caso há diferença significativa entre os resultados, pois o valor-p é inferior ao valor do nível de significância (0,05) adotado. Para se descobrir entre quais amostras existe diferença significativa, foi realizado o teste de Tukey com nível de confiança de 95% para os valores do conteúdo de proteína, onde o resultado para tal teste está apresentado na Tabela 13.

Tabela 13. Teste de Tukey com nível de confiança de 95% - Conteúdo de Proteína, amostras obtidas com e sem uso de ultrassom

Amostra	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7
	0,3466 L	0,304 M	0,1349 N	0,3250 O	0,2220 P	0,2237 Q	0,2284 R
1	0,1585 a	a L	a M	a O	a P	a Q	a R
2	0,2364 b	b L	b M	b N	b O		
3	0,3050 c		c N		c P	c Q	c R
4	0,3610 d		d M	d N		d P	d Q
5	0,2697 e	e L		e N	e O	e P	e Q
6	0,2556 f	f L	f M	f N	f O		
7	0,3644 g		g M	g N		g P	g Q
8	0,2500 h	h L	h M	h N	h O		
9	0,1909 i	i L	i M	i N	i O		
10	0,2120 j	j L	j M	j N	j O		
11	0,2581 k	k L	k M	k N	k O		

Letra minúscula seguida de letra maiúscula significam a existência de diferença estatística significativa entre os valores, de acordo com o teste de Tukey com nível de confiança de 95%.

Ao se realizar a comparação das amostras que passaram pelo processo de extração com ondas ultrassônicas, com as amostras que não foram submetidas ao ultrassom, notou-se que o uso desta técnica quando se trata do conteúdo de proteína não é tão relevante, pois em alguns casos, o seu uso representou uma variação pequena, ou ainda, mesmo sendo feito o uso das ondas ultrassônicas, a concentração de proteína ficou inferior à das amostras que não passaram pelo sonicador de ponteira.

Na Tabela 14 está apresentado o resultado da análise de variância para os valores da atividade enzimática das amostras obtidas com o auxílio das ondas ultrassônicas, e para as amostras extraídas sem o emprego de ultrassom, para tal análise, empregou-se um valor de 0,05 (5%) para o nível de significância (α).

Tabela 14. Análise de Variância – Atividade Enzimática, amostras obtidas com e sem uso de ultrassom

Fonte da variação	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	12,9196	17	0,759976	191,7126	3,98E-30	1,915321
Dentro dos grupos	0,142709	36	0,003964			
Total	13,0623	53				

Ao analisar os dados da análise de variância expostos na Tabela 14, constatou-se que neste caso, existe diferença significativa entre os valores, pois o valor-p é menor que o valor do nível de significância (0,05) empregado. Para se descobrir entre quais amostras há diferença significativa, foi realizado o teste de Tukey com nível de confiança de 95% para os valores da atividade enzimática. O resultado para tal teste está apresentado na Tabela 15.

Tabela 15. Teste de Tukey com nível de confiança de 95% - Atividade Enzimática, amostras obtidas com e sem uso de ultrassom

Amostra	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7
U mL ⁻¹	0,1460 L	0,3719 M	0,0000 N	0,4545 O	0,0220 P	0,0000 Q	0,0000 R
1	0,2617 a		a N		a P	a Q	a R
2	0,3416 b	b L	b N		b P	b Q	b R
3	0,6171 c	c L	c M	c N	c P	c Q	c R
4	0,9284 d	d L	d M	d N	d O	d P	d Q
5	1,314 e	e L	e M	e N	e O	e P	e Q
6	0,9284 f	f L	f M	f N	f O	f P	f Q
7	1,6226 g	g L	g M	g N	g O	g P	g Q
8	0,9449 h	h L	h M	h N	h O	h P	h Q
9	0,6584 i	i L	i M	i N	i O	i P	i Q
10	0,8760 j	j L	j M	j N	j O	j P	j Q
11	0,9229 k	k L	k M	k N	k O	k P	k Q

Letra minúscula seguida de letra maiúscula significam a existência de diferença estatística significativa entre os valores, de acordo com o teste de Tukey com nível de confiança de 95%.

Quando se trata da atividade enzimática, o uso das ondas ultrassônicas se mostrou bastante promissor, sendo que a sua aplicação resultou em um aumento significativo para todas as amostras, com exceção da amostra 1, onde o aumento desse parâmetro não foi estatisticamente significativo. Esta melhora na eficiência pode ser explicada devido ao ultrassom promover a cavitação no meio, e isso acaba facilitando o rompimento da parede celular do tecido vegetal, o que resulta em um aumento na liberação do produto intracelular, melhorando assim a eficiência do processo de extração.

Na Tabela 16 está disponível o resultado da análise de variância para os valores da atividade específica das amostras extraídas com auxílio de ultrassom, e para as amostras extraídas sem o emprego do sonicador, para tal análise, empregou-se um valor de 0,05 (5%) para o nível de significância (α).

Tabela 16. Análise de Variância – Atividade Específica, amostras obtidas com e sem uso de ultrassom

Fonte da variação	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	145,987	17	8,587472	144,8691	5,65E-28	1,915321
Dentro dos grupos	2,133988	36	0,059277			
Total	148,121	53				

Ao verificar os dados da análise de variância apresentados na Tabela 16, notou-se que neste caso, há diferença estatística significativa entre os resultados, pois o valor-p é menor que o valor do nível de significância (0,05) utilizado, sendo assim, para se descobrir entre quais amostras há diferença significativa, foi realizado o teste de Tukey com nível de confiança de 95%, disponível na Tabela 17, para os valores da atividade específica.

Tabela 17. Teste de Tukey com nível de confiança de 95% - Atividade Específica, amostras obtidas com e sem uso de ultrassom

Amostra	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	
	U mg ⁻¹	0,4212 L	1,2221 M	0,0000 N	1,4000 O	0,0991 P	0,0000 Q	0,0000 R
1	1,6530 a	a L	a M	a N		a P	a Q	a R
2	1,4467 b	b L	b M	b N		b P	b Q	b R
3	2,0230 c	c L	c M	c N		c P	c Q	c R
4	2,5706 d	d L	d M	d N	d O	d P	d Q	d R
5	4,8721 e	e L	e M	e N	e O	e P	e Q	e R
6	3,6307 f	f L	f M	f N	f O	f P	f Q	f R
7	4,4539 g	g L	g M	g N	g O	g P	g Q	g R
8	3,7800 h	h L	h M	h N	h O	h P	h Q	h R
9	3,4468 i	i L	i M	i N	i O	i P	i Q	i R
10	4,1321 j	j L	j M	j N	j O	j P	j Q	j R
11	3,5761 k	k L	k M	k N	k O	k P	k Q	k R

Letra minúscula seguida de letra maiúscula significam a existência de diferença estatística significativa entre os valores, de acordo com o teste de Tukey com nível de confiança de 95%.

Por fim, ao avaliar a atividade específica, verificou-se que os resultados das amostras obtidas com auxílio de ultrassom foram estatisticamente melhores quando comparados com os valores das amostras obtidas sem o emprego das ondas ultrassônicas.

Esta influência positiva que as ondas ultrassônicas exerceram na obtenção do extrato bruto de bromelina, também foi verificada no estudo realizado por ZANETTE *et. al.* (2017), no qual, quando foram comparados os resultados obtidos com e sem o auxílio das ondas ultrassônicas, foi verificado uma real melhora na eficiência do processo de obtenção de extrato bruto de bromelina.

7. CONCLUSÃO

Com a finalização dos experimentos, chegou-se à conclusão que o uso de ultrassom atua de maneira positiva na obtenção do extrato bruto de bromelina do caule do abacaxi.

Ao analisar os resultados, notou-se que o uso de 9°C de temperatura, não trouxe nenhum ganho significativo para os resultados das amostras. No caso da potência do equipamento, o emprego de 90%, atuou somente de maneira positiva, quando se trabalhou com 9°C. Com isso, pode-se concluir que o uso de 25°C de temperatura e 20% da potência do sonificador de ponteira são ideais para o processo de extração com auxílio de ultrassom, fato extremamente importante, pois essas condições representam menores custos operacionais. Quando se tratou do tempo de extração, a elevação desse parâmetro, de maneira geral, trouxe uma melhora para os resultados do processo, em que somente no caso do conteúdo de proteína das amostras 6 (25°C, 90% e 1 min) e 8 (25°C, 90% e 9 min), tal fato não implicou em um aumento nos valores.

Dentre as condições experimentais aplicadas neste estudo, pode-se afirmar que o uso de 25°C de temperatura, tempo de extração de 9 minutos e 20% da potência do equipamento, condições aplicadas na amostra 7 (25°C, 20% e 9 min), resultou nos melhores valores para o conteúdo de proteína, e para a atividade enzimática, sendo estes estatisticamente melhores em relação aos resultados das demais amostras, com exceção do conteúdo de proteína, quando comparado com o da amostra 4 (9°C, 90% e 9 min). Quando se tratou da atividade específica, a amostra 7 (25°C, 20% e 9 min) apresentou o segundo melhor resultado, ficando somente atrás da amostra 5 (25°C, 20% e 1 min), porém a diferença entre tais amostras não é estatisticamente significativa.

Por último, ao comparar os resultados das amostras obtidas com auxílio de ultrassom, com os resultados das amostras que não foram submetidas ao processo de extração com ondas ultrassônicas, concluiu-se que as ondas ultrassônicas de fato aumentam a eficiência do processo de extração de extrato bruto de bromelina.

REFERÊNCIAS

- ABACAXI. **Portal São Francisco**, 2020. Disponível em: <<https://www.portalsaofrancisco.com.br/alimentos/abacaxi>>. Acesso em: 17 de mar. de 2020.
- ABREU, Danielly Cristina Alves. **DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS DE AFINIDADE PARA A SEPARAÇÃO DE BROMELINA**. 2019. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019. Disponível em: http://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/30080/1/Disserta%C3%A7%C3%A3o_Danielly%20Cristina%20Alves%20Abreu.pdf. Acesso em: 13 jan. 2020.
- ANDRÉ, Jéssica Leite; NOBRE, Nathália Coelho. **Catálise Enzimática**. 2012. 12 f. Curso de Engenharia Florestal, Química e Biologia, Universidade Estadual do Maranhão, Maranhão, 2012.
- ANJOS, Gabriel Terra Castilho dos. **Desenvolvimento da extração assistida por ultrassom para determinação de manganês em pó bronzeador por FAAS**. 2019. 38 f. TCC (Graduação) - Curso de Química Industrial, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/28509/4/DesenvolvimentoExtracaoAssistida.pdf>. Acesso em: 01 maio 2020.
- ATIVIDADE enzimática. Disponível em: http://www.ufrgs.br/alimentus1/pao/ingredientes/ing_enzimas_atividade.htm. Acesso em: 12 jun. 2019.
- BABU, B. Ravindra; RASTOGI, N. K.; RAGHAVARAO, K. S. M. S.. Liquid-liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. **Chemical Engineering And Processing: Process Intensification**, [s.l.], v. 47, n. 1, p. 83-89, jan. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cep.2007.08.006>
- BALDINI, V.L.S *et al.* **Ocorrência da bromelina e cultivares de abacaxizeiro**. Colet. Inst. Tecnol. Alimentos, v. 23, n.1, p. 44-55, 1993.
- BARREIROS, André Luís Bacelar Silva; BARREIROS, Marizeth Libório. **Química de Biomoléculas**. São Cristóvão. 2012 (Apostila de Química de Biomoléculas).
- BARROS, K. V. G. **Caracterização e purificação da enzima bromelina derivada do curauá (*Ananas erectifolius*) em sistema bifásico aquoso PEG/fosfato**. 2009. Dissertação de mestrado – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.
- BERG, Jeremy M.; TYMOCZKO, John L.; STRYER, Lubert. **Bioquímica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1114 p.
- BERNELA, M., AHUJA, M., THAKUR, R. Enhancement of anti-inflammatory activity of bromelain by its encapsulation in katira gum nanoparticles, *Carbohydrate Polymers*, v. 143, p. 18-24, 2016.

BISCEGLI, Clovis Isberto. **Conceitos da Física do Ultra-Som**. 1. ed. São Paulo: Embrapa, 2003. 19 p.

BORRACINI, H. M. P. **Estudo do processo de extração da bromelina por micelas reservas em sistema descontínuo**. 2006. Dissertação de mestrado – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAMPBELL, Mary K. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 752 p.

CAMPESE, G. M. **Extração e recuperação da bromelina em sistemas de duas fases aquosas PEG4000-POLICAJU**. 2004. Tese de pós-graduação – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

CAVALHEIRO, C. V. **Extração de compostos fenólicos assistida por ultrassom e determinação de ácidos graxos e minerais em folhas de *Olea europaea* L.** 2013. Dissertação de mestrado – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

CÉSAR, A. C. W. **Análise de viabilidade econômica de um processo de extração e purificação da bromelina do abacaxi**. 2005. Tese de doutorado – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

CHAMPE, Pamela C.; HARVEY, Richard A.; FERRIER, Denise R. **Bioquímica Ilustrada**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 533 p.

CHEMAT, F.; HUMA, Z.; KHAN, M. K. **Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction**. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 18, p. 813-835, 2011.

CHITARRA, Guilherme Silva. **Aplicação do método da sonoquímica na avaliação da degradabilidade de polímeros**. 2013. 34 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013. Disponível em:
<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/108457/000946163.pdf?sequence=1>.
 Acesso em: 30 abr. 2020.

COELHO, M. A. Z. Estabilidade de Enzimas. **BIOSE Biological Systems Engineering**, 2019. Disponível em:
http://www.eq.ufrj.br/biose/nukleo/aulas/Enzimol%20Grad/EOB483_aula7.pdf>. Acesso em: 14 de jan. 2020.

COELHO, D. F. **Purificação de bromelina dos resíduos de abacaxi (*Ananas comosus* L. *Merril*) por precipitação integrada a sistema bifásico aquoso (PEG/Sulfato de Amônio) não convencional**. 2012. Dissertação de mestrado – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

COLEÇÃO PLANTAR. Brasília: Embrapa, 2006. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/120509/1/00013370.pdf>>. Acesso em: 05 maio 2021.

CORSO, C.A.; WALISZEWSKI, K.N.; WELTI-CHANES, J. Pineapple fruit bromelain affinity to different protein substrates, *Fruit Chemistry*, v.133, p. 631-635, 2012.

COURI, Sonia; DAMASO, Mônica Caraméz Triches. *Árvore do conhecimento: Enzimáticos. Ageitec*, [s. d.]. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT000fid5sgif02wyiv80z4s473v6o7sud.html>. Acesso em: 14 de fev. de 2020.

CRESTANI, Maraisa *et al.* Das Américas para o mundo – origem, domesticação e dispersão do abacaxizeiro. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 40, n. 6, p. 1473-1483, jun. 2010.

DALAGNOL, L. M. G. **Avaliação do uso do ultrassom na extração do mosto da uva cabernet sauvignin e na atividade enzimática.** 2017. Dissertação de pós-graduação – Instituto de ciência e tecnologia de alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

DA LUZ, L.P. **Estudo do ultra-som como técnica de extração de carvões e caracterização dos hidrocarbonetos poliaromáticos.** 1998. Dissertação de pós-graduação – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

DE LIMA, Silvil Luís Toledo *et al.* Estudo da atividade proteolítica de enzimas presentes em frutos. *Química Nova na Escola*, 28, p. 47-49, 09 nov. 2006. Trimestral.

DE MATOS, Aristoteles Pires *et al.* **A cultura do abacaxi.** 2. ed. Brasília: Embrapa, 2006. 91 p.

DE SÁ LEITÃO, A. L. O. **Avaliação de métodos de rompimento celular e de diferentes metais imobilizados em resina Streamline Chelating para a purificação do antígeno 503 de *Leishmania i. chagasi*.** 2017. Dissertação de mestrado – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.

EXTRAÇÃO e preservação ultrassônica. **Hielscher Ultrasound Technology**, 2020. Disponível em: <https://www.hielscher.com/pt/extraction_01.htm>. Acesso em: 14 de dez. de 2020.

FATORES que afetam a atividade enzimática. **Só Biologia**, 2020. Disponível em: <https://www.sobiologia.com.br/conteudos/quimica_vida/quimica12.php>. Acesso em: 12 de mar. de 2020.

FERREIRA, Layane Alves *et al.* A utilização de resíduos das agroindústrias de suco de abacaxi para a produção de bromelina. *Sítio Novo*, Tocantins, v. 1, p.247-257, 03 out. 2017. Trimestral. Disponível em: <http://sitionovo.ifto.edu.br/index.php/sitionovo/article/view/91/53>. Acesso em: 25 mar. 2020.

FEY, Angela. Fatores que afeta a atividade enzimática. **Bioblog**, 2016. Disponível em: <<http://www.bioblog.com.br/fatores-que-afetam-a-atividade-das-enzimas/>>. Acesso em: 13 de mar. de 2020.

FRANÇA-SANTOS, A. *et al.* **Estudos bioquímicos da enzima bromelina do *Ananas comosus* (abacaxi)**. São Cristovão, Sergipe, 2009. Disponível em: <https://scientiaplena.org.br/sp/article/viewFile/749/402>. Acesso em: 29 abr. 2019.

GODOI, Patrícia Helena de. **Estudo da atividade enzimática da bromelina pura em solução em diferentes temperaturas e pH**. 2007. 62 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

GOGATE P.R.; PANDIT A.B. A review and assessment of hydrodynamic cavitation as a technology for the future. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 12, p. 21-27, 2005.

GOUVEIA, Rosimar. Velocidade do som. **Toda Matéria**, 2021. Disponível em: <<https://www.todamateria.com.br/velocidade-do-som/>>. Acesso em: 2 de mai. de 2021.

HARRISON, S. T. L. Bacterial cell disruption: a key unit operation in the recovery of intracellular products. **Biotechnology Advances**, v. 9, n. 2, p. 217-240, 1991.

HO, C. W. *et al.* Efficient mechanical cell disruption of *Escherichia coli* by an ultrasonicator and recovery of intracellular hepatitis B core antigen. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 1829-1834, 2006.

IADEROZA, M.; BALDINI, V. L. S. A importância da análise enzimática em alimentos. In: **Enzimas e a qualidade de vegetais processados**. Campinas: ITAL, 1991. p. 37-51.

KIELING, Dirlei Diedrich. **Enzimas Aspectos Gerais**. Florianópolis, 2002. Apostila do Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

KUNITZ, M. Crystalline trypsin inhibitor. II. General properties. *Journal of general Physiology*, v.30, p.295-310, 1947.

LIMA, Silvio Luís Toledo de et al. Estudo da Atividade Proteolítica de Enzimas Presentes em Frutos. **Química Nova na Escola**, v. 28, n. 0, p. 47-49, 9 nov. 2008. Disponível em: <http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc28/11-EEQ-6906.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2020.

LOPES, Leonardo de Souza. **Otimização da determinação de atividade enzimática como metodologia para avaliação em detergentes enzimáticos de uso restrito em estabelecimentos de assistência à saúde**. 2009. Curso de especialização em controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados a vigilância sanitária – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2009.

MACHADO JR., F. R. D. S. **Ruptura celular, extração e encapsulamento de astaxantina de *Haematococcus pluvialis***. 2014. Tese de doutorado – Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

MAGALHÃES, Lana. Proteínas. **Toda Matéria**, 2018. Disponível em: <<https://www.todamateria.com.br/proteinas/>>. Acesso em: 9 de mar. de 2020.

MASON, T. J.; LORIMER, J. P. Sonochemistry: **Theory, Applications and Uses of Ultrasonnd in Chemistry**, Ellis Horwood Limited, Chichester, UK, 2002.

MASON, T. J. *et al.* Application of ultrasound. **Emerging technologies for food processing**. v. 32, p. 3-351, 2005.

MATHIAS, J. **Globo rural**. 2013. Disponível em: <https://revistagloborural.globo.com/vida-na-fazenda/como-plantar/noticia/2013/12/como-plantar-abacaxi.html>. Acesso em: 04 mai. 2019.

MORAIS, Douglas et al. Ondas Ultrassônicas: teoria e aplicações industriais em ensaios não-destrutivos. **Revista Brasileira de Física Tecnológica Aplicada**, Ponta Grossa, v. 4, n. 1, p. 16-33, jun. 2017.

MOURA, Mariele Nair de Campos. **ESTUDO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA BROMELINA PURA E DO RESÍDUO DE ABACAXI EM DIFERENTES PH E TEMPERATURA CONSTANTE**. 2010. 49 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Sistemas de Processos Químicos e Informática, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

NELSON, David L.; COX, Michael M.. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1220 p.

NEVES, L. C. M. **Obtenção da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase utilizando Saccharomyces cerevisae W303-181**. Dissertação de mestrado. Departamento de ciências farmacêuticas. Área de tecnologia de fermentações. Universidade de São Paulo. São Paulo. Brasil. 2003.

O'DONNELL, C. P. *et al.* Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, n. 7, p. 358-367, 2010.

OLIVEIRA NETO, Aroldo Antonio de. **A participação do abacaxi no desenvolvimento econômico nas regiões produtoras**. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento, 2020. 44 p.

PÉCORRA, J. D.; GUERISOLI, D. M. Z. Ultra-som. **Departamento of Restorative Dentistry**, 03 nov. 2004. Disponível em: <http://www.forp.usp.br/restauradora/us01.htm>. Acesso em: 13 jun. 2019.

PEDREIRA, Carla M. S.. **Enzimas proteolíticas de plantas usadas no amaciamento da carne: bromelina, ficina e papaína**. 2001. Disponível em: <<https://www.beefpoint.com.br/enzimas-proteoliticas-de-plantas-usadas-no-amaciamento-da-carne-bromelina-ficina-e-papaina-4977/>>. Acesso em: 28 jul. 2020.

PEDRO, C. R. L. **Ação de ultra-som em leveduras no processo de fermentação etanólica**. 2008. Dissertação de mestrado – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2008.

PROCESSADOR Ultrassônico / Sonicador de Ponteira. **BIOVERA**, 2019. Disponível em: <<https://www.biovera.com.br/noticias/saiba-tudo-sobre-processador-ultrassonico-sonicador-de-ponteira-sonicador/>>. Acesso em: 24 de abr. de 2020.

PRODUÇÃO brasileira de abacaxi. **Embrapa**, 2019. Disponível em: <http://www.cnpmf.embrapa.br/Base_de_Dados/index_pdf/dados/brasil/abacaxi/b1_abacaxi.pdf>. Acesso em: 14 de fev. de 2020.

PROTEASE. **Infinity Pharma**. Disponível em: <<https://infinitypharma.com.br/uploads/insumos/pdf/p/protease.pdf>>. Acesso em: 15 de dez. de 2019.

RIBEIRO, Renato. Ondas sonoras e o sentido da audição. **Estado de Minas**, 2015. Disponível em: <<https://www.em.com.br/app/noticia/especiais/educacao/enem/2015/11/11/noticia-especial-enem,706844/ondas-sonoras-e-a-capacidade-do-homem-em-emitir-sons.shtml>>. Acesso em: 9 de abr. de 2020.

ROWAN, A. D.; BUTTLE D. J.; BARRET, A. J. The cysteine proteinases of the pineapple plant. *Biochemical Journal*, 266: 869-75 (1990).

RUDOLFO, Domingo Haroldo; REINHARDT, Conrado. **Colheita e beneficiamento**. Abacaxi: pós-colheita. Brasília, DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia; Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2000, 45 p., il. (Frutas do Brasil, 5).

SILVA, Roberto Afonso da. **Caracterização físico-química e purificação da bromelina do Ananas comosus (L.) Merrill**. 2008. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Bioquímica e Fisiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

SOARES, P. A. G. *et al.* Purification of bromelain from pineapple wastes by ethanol precipitation. **Separation and Purification Technology**, p. 389-395, jul. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2012.06.042>.

SONICADOR de Ponteira Ultrassônico. 2018. Disponível em: <<https://omics.com.br/produto/sonicador-de-ponteira-ultrassonico-eco-sonics/>>. Acesso em: 05 maio 2021.

TACON, K. C. B.; SANTOS, H. C. O.; AMARAL, W. N. A história da ultrassonografia no Brasil e no mundo. **Efdeportes.com**, 2012. Disponível em: <<https://www.efdeportes.com/efd167/a-historia-da-ultrassonografia.htm>>. Acesso em: 7 de fev. de 2020.

TEIXEIRA, João Batista Picinini. Conceitos em Fitoterapia: Uma revisão da literatura. Abacaxi/Bromelina. **Universidade Federal de Juiz de Fora**, 2010. Disponível em: <<https://www.ufjf.br/proplamed/atividades/fitoterapia/2157-2/>>. Acesso em: 3 de mar. de 2020.

TREMACOLDI, C. R. **Proteases e inibidores proteases na defesa de plantas contra pragas**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2009. 33 p.

USOS e Benefícios da Bromelina. **Biótica Magistral**, 2015. Disponível em: <<http://sistema.boticamagistral.com.br/app/webroot/img/files/Usos%20e%20benef%C3%ADcios%20da%20Bromelina%20-%20Ed-converted.pdf>>. Acesso em: 9 de mar. de 2020.

VIEIRA, Helena Soraia Fernandes. **Caracterização de enzimas proteolíticas produzidas por bactérias de origem marinha**. 2013. 54 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Alimentar, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2013.

WILLIAMS, A. R. **Ultrasound: Biological effects and potential hazards**. 1 ed. Orlando, Academic press, p. 321, 1983.

ZANETE, M. M. D. *et al.* Avaliação do uso de ondas ultrassônicas na obtenção do extrato de bromelina. In: Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados, 38, 2017, Maringá.