

RECUPERAÇÃO DE BROMELINA DE RESÍDUOS DO ABACAXI (ANANAS COMOSUS) POR MEIO DE PROCESSOS COM MEMBRANAS

BROMELAIN RECOVERY FROM PINEAPPLE WASTE BY MEANS OF MEMBRANE PROCESSES

Igor Lopes de Almeida^a, Beatriz Godoi de Nogueira^a, Kátia Cecília de Souza Figueiredo^a

^aUniversidade Federal de Minas Gerais – UFMG

gorlopesalmeida@gmail.com, beatrizgodoinog@gmail.com, katia.cecilia@gmail.com

Submissão: 03 de dezembro de 2022

Aceite: 16 de novembro de 2023

Resumo

A disposição adequada de resíduos agroindustriais é um dos principais problemas envolvendo o processamento de alimentos. A produção de abacaxi vem aumentando sistematicamente ao longo dos anos, o que torna crescente a preocupação com a destinação apropriada do resíduo gerado. A bromelina é um conjunto de enzimas conhecidas como proteases, que quebram ligações peptídicas. O objetivo deste estudo foi comparar as propriedades de transporte para a recuperação de bromelina de resíduos da casca, da coroa e do talo de abacaxi utilizando membranas poliméricas planas de diálise e de ultrafiltração, ambas de éster de celulose. A estratégia experimental consistiu na extração com água das substâncias solúveis dos resíduos. Após filtração e microfiltração para remoção de sólidos suspensos, avaliaram-se duas rotas alternativas: a separação por membrana de ultrafiltração (10 kDa) e de diálise (14 kDa). Os resultados foram comparados em relação às propriedades de transporte, bem como atividade enzimática. Observou-se uma elevada concentração de proteínas totais no extrato da casca, seguida pelo talo e pela coroa. Comparando-se os dados de permeação, ficou evidente que a ultrafiltração foi mais efetiva na separação das frações de proteína, tanto em relação ao fluxo permeado quanto na rejeição ou recuperação de bromelina, considerando o elevado fator de diluição das amostras de diálise.

Palavras-chave: Atividade enzimática; Bromelina; Diálise; Resíduo de abacaxi; Ultrafiltração.

Abstract

The suitable disposal of agro-industrial waste is one of the major problems in food processing. The production of pineapple is increasing over the years, which requires the treatment of its waste. Bromelain is a group of substances known as proteases, able to break peptide bonds. The goal of this work is the comparison of transport properties in bromelain recovery from pineapple waste (stem, crown, peel) by means of flat polymeric membranes of dialysis and ultrafiltration, both from cellulose. The experimental strategy comprised in leaching the waste with water, followed by filtration and microfiltration for suspended solids removal. Then, two alternate routes were investigated: ultrafiltration (10 kDa) and dialysis (14 kDa). The results were compared regarding transport properties as well as enzyme activity. High total protein was achieved for peel, followed from stem and crown waste. Transport properties showed that ultrafiltration was more effective in separation the proteins, regarding both flux and rejection coefficient, upon considering the high dilution of permeate from dialysis.

Keywords: enzyme activity; bromelain; dialysis; pineapple waste; ultrafiltration.

1 INTRODUÇÃO

A disposição adequada de resíduos agroindustriais é um dos principais problemas envolvendo o processamento de alimentos. A

conversão de resíduos da indústria hortifrutícola, tais como aparas de frutas e vegetais, cascas, talos, sementes e outros materiais, em subprodutos de maior valor agregado nem sempre é incentivada. Normalmente, tais resíduos são

utilizados como ração animal e matéria-prima para a fabricação de fertilizantes ou mesmo enviados para a compostagem ou aterros sanitários. No entanto, uma parcela significativa muitas vezes é descartada de forma imprudente, seja pelo alto custo de transporte ou mesmo pela disponibilidade limitada dos citados aterros (GIL; MAUPOEY, 2018).

A conversão destes resíduos voltada para o uso na agroindústria, vem sendo cada vez mais investigada (UPADHYAY; LAMA; TAWATA, 2010). De fato, há um crescente interesse na valorização de resíduos da indústria alimentícia, em consequência dos avanços tecnológicos na engenharia e processamento de subprodutos (GIL; MAUPOEY, 2018). Nesse cenário, o abacaxi (*Ananas comosus*) torna-se um promissor meio de estudo, porque sua produção, seja do corte fresco ou do próprio suco da fruta, é reconhecidamente a indústria que mais gera resíduos sólidos. Estima-se que aproximadamente 75 % da fruta constitui o chamado resíduo industrial, sendo composto pelo talo, coroa, folhas e casca (RODA *et al.*, 2016). Este resíduo contém diversas substâncias de alto valor agregado e com grande potencial de exploração, como a celulose (fibra insolúvel), açúcares simples e a principal delas: a bromelina (BAN-KOFFI; HAN, 2009).

O abacaxi pertence à família *Bromeliaceae* e é uma das frutas mais populares no mundo. A produção de abacaxi vem aumentando sistematicamente ao longo dos anos, o que torna crescente a preocupação com a destinação apropriada do resíduo gerado (NOR *et al.*, 2015). No Brasil, foram produzidos 1,545 bilhões de frutos em 2021, sendo que o Pará é o maior produtor, seguido pela Paraíba e por Minas Gerais (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2022). A bromelina é uma mistura de enzimas proteolíticas obtida a partir do abacaxi. Ela é comumente utilizada em diversos ramos industriais, desde setores cosméticos, nutricionais, farmacêuticos, podendo inclusive ser usada no tratamento contra o câncer (BHUI *et al.*, 2009). No entanto, embora inicialmente a bromelina tenha sido definida como uma mistura de enzimas, hoje ela engloba uma definição mais ampla, incluindo qualquer protease que seja extraída de qualquer membro da família *Bromeliaceae*.

As proteases que constituem a bromelina são endopeptidases cisteínicas que catalisam a hidrólise das ligações peptídicas de aminoácidos N-terminais com um grupo amina em uma de suas extremidades (COLLETI *et al.*, 2021). A bromelina

inclui, portanto, diversos compostos, como glicosidases, fosfatases, ribonucleases, celulases, peroxidases e glicoproteases que quebram, principalmente, ligações alinil, leucil e glicil (COLLETI *et al.*, 2021). Tais enzimas podem estar presentes em diferentes proporções, cuja divergência se deve a diversos fatores, como localização geográfica da fruta, o tipo de terra e modo de cultivo da planta, o método de extração utilizado e, principalmente, a parte da planta que foi utilizada na extração. Portanto, a atividade enzimática da bromelina pode variar dependendo de qual parte do abacaxi está sendo utilizada na extração. A massa molar da bromelina varia de 20 kDa a 31 kDa e ponto isoelétrico entre 4,6 e 10 (NOVAES *et al.*, 2016). Além disso, a bromelina presente no talo do abacaxi (EC 3.4.22.32) é a mais abundante, quando comparada com as outras partes da fruta, com um ponto isoelétrico de 9,5, enquanto que a bromelina presente na polpa da fruta (EC 3.4.22.33) é encontrada em menor quantidade e possui um ponto isoelétrico de 4,6 (ARSHAD *et al.*, 2014; NOVAES *et al.*, 2016).

A produção comercial da bromelina envolve diversas etapas, como extração, purificação, secagem e empacotamento do produto obtido. Nos estágios citados, a etapa de purificação é crucial, já que afeta substancialmente a atividade enzimática do produto obtido. Dessa forma, seguida da extração, a purificação é a etapa mais laboriosa e cara de todo processamento da bromelina. Portanto, diversos métodos de purificação vêm sendo estudados, como a cromatografia de troca iônica, sistema micelar reverso, fracionamento por sulfato de amônio, sistema aquoso bifásico e processos de filtração com membranas (ABREU; FIGUEIREDO, 2019; NOR *et al.*, 2015). Dentre eles, a ultrafiltração (UF) tem sido investigada nos últimos anos (ABREU; FIGUEIREDO, 2019; GAMARRA *et al.*, 2022; NOR *et al.*, 2015; NOR *et al.*, 2016; NOR *et al.*, 2018; SIMÕES *et al.*, 2021).

Todos os processos possuem prós e contras, conforme relatado na literatura (ABREU; FIGUEIREDO, 2019). Assim, por exemplo, a cromatografia de troca iônica possui a desvantagem de ser um processo de alto custo e de difícil escalonamento, mas a vantagem de operar em condições operacionais amenas. Os sistemas micelares reversos apresentam elevada seletividade, mas a dificuldade de escalonamento dada a necessidade de adição de surfactante aliado ao controle de pH e força iônica dificultam implementação. A precipitação utilizando sulfato

de amônio é um método mais barato, mas a elevada quantidade de sal inserida compromete a pureza do produto. Os sistemas aquosos bifásicos apresentam a vantagem do meio aquoso, mas os mecanismos de separação ainda não são completamente conhecidos e envolvem elevadas concentrações salinas. No caso das membranas, as vantagens de serem modulares e facilitarem o aumento de escala precisam ser consideradas juntamente com a tendência à incrustação, o que requer um melhor entendimento dos fenômenos envolvidos.

Simões *et al.* (2021) compararam a purificação da bromelina do resíduo do abacaxi por meio da UF e de sistemas aquosos bifásicos (SAB) e da integração dos dois processos utilizando módulos de membranas planas de éster de celulose de 100 kDa e de 3 kDa. O SAB obteve uma recuperação da bromelina de 18,5 % enquanto a UF revelou uma recuperação de 93,2 %.

Gamarra *et al.* (2022) investigaram a remoção de bromelina do suco de abacaxi utilizando microfiltração (MF) e UF em sistemas de membranas planas e de fibra oca. O sistema utilizando membranas planas de poli(fluoreto de vinila) de 0,1 µm, seguido pela membrana de éster de celulose, com massa molar de corte de 10 kDa, retornou o melhor resultado. A recuperação de bromelina foi de 85 %-87 % da bromelina na etapa de microfiltração e de 100 % na ultrafiltração.

Nor *et al.* (2016) utilizaram o resíduo do abacaxi como matéria-prima, para obtenção de bromelina, utilizando membranas cerâmicas tubulares de ultrafiltração de óxido de zircônio de 75 kDa e de 10 kDa em duas etapas. No primeiro estágio, foi obtida uma recuperação de 96,8 % da bromelina e um fluxo de permeado de 11,6 kg/m²h, enquanto no segundo estágio a pureza da enzima foi aumentada em 2,5 vezes e o fluxo de permeado obtido foi de 6,2 kg/m²h. O aumento do grau de recuperação no estágio 2 representou uma maior pureza da enzima retida, no entanto, houve uma maior perda da atividade proteica nessas condições, ao ser aplicada uma velocidade de escoamento de 7,5 m/s no módulo.

Desta forma, embora a UF seja promissora, diversos aspectos relacionados aos materiais e configuração de módulos ainda precisam ser esclarecidos de modo a minimizar a incrustação, com manutenção da atividade enzimática. Membranas poliméricas são mais utilizadas devido ao baixo custo comparado com as cerâmicas. Com relação à configuração de módulo, as membranas

tubulares permitem uma hidrodinâmica melhor, mas com comprometimento da atividade proteolítica da enzima.

O objetivo deste estudo foi comparar as propriedades de transporte para a recuperação de bromelina de resíduos da casca, da coroa e do talo de abacaxi utilizando membranas poliméricas planas de diálise (14 kDa) e de ultrafiltração (10 kDa), ambas de éster de celulose. Embora o diâmetro de poros seja na mesma faixa, ultrafiltração e diálise se diferenciam na força motriz para o transporte: a primeira utiliza uma diferença de pressão entre a alimentação e o permeado, enquanto a segunda consiste em diferença de concentração. A hipótese investigada é que condições brandas de separação (diálise), que não envolvem diferença de pressão sobre a solução, e, portanto, sobre a proteína, sejam suficientes para obtenção de um bom rendimento, ou seja, recuperação de bromelina.

A diálise tem sua aplicação mais conhecida na área médica, sendo responsável pela substituição dos rins debilitados dos pacientes. O processo se baseia na diferença de concentração de espécies dos dois lados de uma membrana seletiva. Neste caso, os poros da membrana possuem os tamanhos adequados para impedir a permeação de moléculas com diâmetro cinético maior, mas a força motriz, diferentemente da ultrafiltração, não é a diferença de pressão através da membrana, o que pode ajudar a manter a estrutura e, conseqüentemente, a funcionalidade das enzimas.

2 METODOLOGIA

Os abacaxis (*Ananas comosus*) utilizados neste estudo foram adquiridos em mercado local de Belo Horizonte, MG, provenientes de Anápolis, GO, em janeiro de 2022 (exsicata New York Botanical Garden, 00873125). Foram utilizadas duas unidades da fruta previamente higienizadas com o uso de uma escova e de água corrente. A casca, a coroa e o talo foram removidos com uma faca e cortados em pequenos pedaços.

Cerca de 100 g de cada uma das partes do abacaxi (casca, coroa e talo) foram submersas em 300 mL de água destilada por uma hora para a extração da bromelina. Desta forma, foi mantida uma proporção de 1:3 g/g de cada uma das partes do abacaxi em relação à água adicionada, considerando o resíduo base úmida, sem tratamento.

Em seguida, cada uma das 3 amostras,

compostas por partes do abacaxi e água destilada, foi transferida para um liquidificador com 550 W de potência e submetida a agitação em velocidade máxima, cerca de 500 rpm, por 3 minutos. A metodologia foi determinada com base em um trabalho anterior do grupo (SIMÕES *et al.*, 2021).

Cada um dos extratos (cerca de 300 mL) foi filtrado, a 25° C, utilizando-se um sistema padrão de filtração, operação frontal, composto por funil de Buchner, frasco Kitasato e bomba de vácuo (Edwards, E2M0.7) por meio de papel de filtro com diâmetro médio de poros de 14 µm (J. Prolab) e área de permeação de 63,6 cm².

Em seguida, as amostras foram microfiltradas em membrana de éster de celulose, com diâmetro médio de poros de 0,22 µm (Millipore), utilizando-se a mesma montagem experimental da filtração convencional. Estas duas etapas (filtração convencional e microfiltração) foram utilizadas com o objetivo de fazer um pré-tratamento do extrato aquoso do resíduo de abacaxi, visando reduzir a presença de sólidos suspensos e também bactérias.

A partir dos extratos microfiltrados, duas amostras de 15 mL de cada um dos três tipos de resíduos foram tratadas por meio de duas rotas alternativas. Na primeira, os três extratos microfiltrados foram submetidos à ultrafiltração com membrana de éster de celulose, com massa molar de corte de 10 kDa (Millipore), em um módulo tipo filtração frontal com diâmetro de 1,5 cm (1,77 cm² de área).

Já na segunda rota, uma membrana de diálise de éster de celulose previamente inchada em água destilada e com massa molar de corte de 14 kDa (Sigma Aldrich) foi investigada. O volume da solução dialisante (água destilada) foi de 1 L, e o tempo de teste foi de 17 horas, com área de permeação estimada em 73 cm². Este tempo elevado de teste foi utilizado para simular um equilíbrio. A Figura 1 ilustra a estratégia experimental.

As soluções obtidas (permeados da MF, UF e diálise) foram caracterizadas em relação ao pH, índice de refração, densidade (método do picnômetro). As propriedades de transporte, ou seja, fluxo permeado (Equação 1) e coeficiente de rejeição (Equação 2), também foram determinadas. Nas Equações 1 e 2, J é o fluxo permeado, V é o volume permeado, t é o tempo de permeação, A é a área da membrana, R é o coeficiente de rejeição e C_p e C₀ são as concentrações de bromelina na alimentação e no permeado, respectivamente.

$$J = \frac{V}{A \cdot t} \quad (1)$$

$$R = 1 - \frac{C_p}{C_0} \quad (2)$$

A determinação de proteína total, PT, foi realizada de acordo com o método de Bradford (BRADFORD, 1976). Resumidamente, uma alíquota da amostra (100 µL) foi transferida para um tubo de ensaio e misturada com a solução de Bradford (2,5 mL). Esta solução consiste em um corante que aumenta a intensidade de cor em função do teor de proteína. Utilizou-se uma curva de calibração, em espectrofotômetro UV-visível, a 595 nm, a partir de uma solução aquosa de albumina de soro bovino como proteína modelo. Os resultados das amostras dos extratos de cada parte do abacaxi foram lidos no mesmo comprimento de onda, 595 nm.

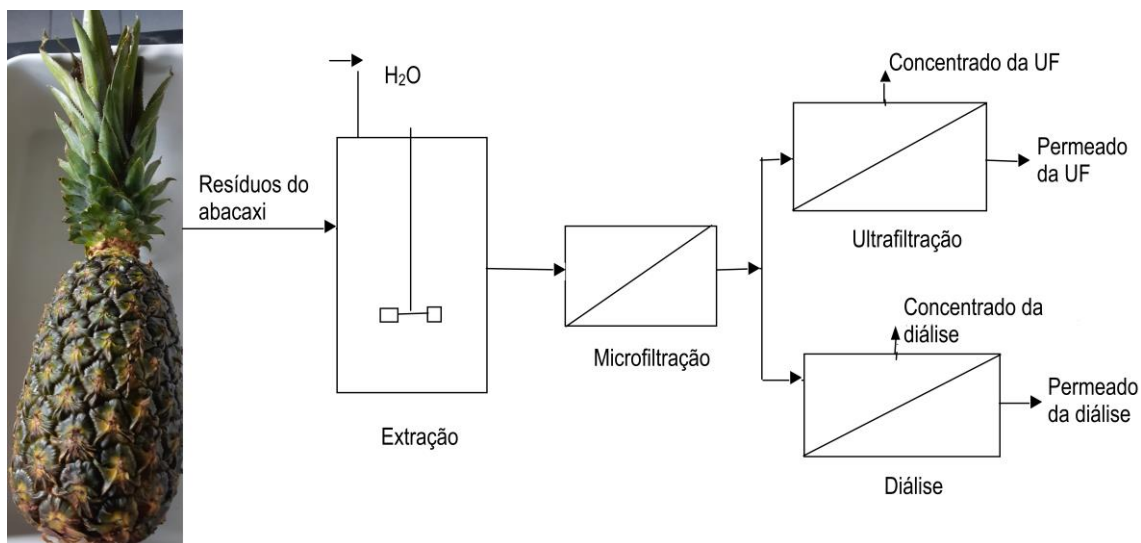
A determinação da atividade de bromelina nas amostras foi realizada de acordo com o método descrito por Simões *et al.* (2021). O método se baseia na hidrólise da caseína 0,5% m/v em tampão tris-HCl pH 9,0. A quantidade de 0,75 mL da amostra (extrato enzimático) foi transferida para um tubo de ensaio, juntamente com 1,5 mL da solução de caseína tamponada em pH 9,0 e 0,15 mL de solução de ativadores, cisteína, 10-2 M, e EDTA, 4 x 10⁻³ M. O tubo de ensaio foi levado a 37° C, por 30 min., quando a reação foi paralisada com a adição de solução de ácido tricloroacético e resfriada a 4° C em geladeira. A suspensão resultante foi microfiltrada e a absorção no espectrofotômetro UV-visível a 275 nm foi determinada. A quantificação da unidade de atividade proteolítica (UAP) da bromelina (U/mL) foi avaliada a partir de uma curva de calibração de tirosina, com absorção em espectrofotômetro UV-visível a 275 nm.

A Equação 3 mostra o cálculo de UAP, na qual m é a massa de tirosina (em µg), obtida pela curva de calibração, V_f, V_a e V_e são os volumes, em mL final no tubo de ensaio (2,4 mL), da amostra, igual a 0,75 mL e na cubeta (2 mL), e t é o tempo da reação, em minutos, igual a 30. A partir do teor de proteína total, PT, em mg/mL, foi calculada a atividade específica, AE, de bromelina (U/mg), conforme a Equação 4.

$$UAP = \frac{m \cdot V_f}{V_a \cdot t \cdot V_e} \quad (3)$$

$$AE = \frac{UAP}{PT} \quad (4)$$

Figura 1: Estratégia experimental utilizada para obtenção da bromelina



Fonte: Autores, 2022

3 RESULTADOS

A caracterização físico-química dos permeados da MF, UF e diálise foi realizada e os resultados são apresentados na Tabela 1. Foram investigados os índices de refração (μ), pH, densidade (ρ) e proteína total (PT) para o permeado da microfiltração, que consistiu na alimentação dos sistemas de UF e de diálise. Dados de densidade para os permeados da ultrafiltração e da diálise não foram realizados, dada a concordância com os dados de índice de refração para o permeado da MF.

Observou-se um índice de refração relativamente baixo para todas as amostras, indicando que a quantidade de sólidos dissolvidos totais na amostra foi pequena. Os valores são

semelhantes à água destilada, indicando baixo rendimento de extração, dada a elevada diluição. A etapa de lixiviação ou extração sólido/líquido deve ser otimizada em ensaios futuros, mas o aumento da temperatura do solvente e mesmo o tipo de solvente extratante empregados são limitados pelo fato de tratar-se de biomoléculas, especialmente proteínas, que podem ser desnaturadas durante o processo. As alternativas mais promissoras devem ser uma melhor agitação do tanque e a diminuição da quantidade de solvente. Por outro lado, o aumento da proporção resíduo/água deve dificultar bastante a etapa de filtração convencional e microfiltração, de modo que uma otimização nesta relação se faz necessária em estudos futuros.

Tabela 1: Resultado dos testes de caracterização físico-química dos permeados de MF, UF e diálise

	Microfiltração				Ultrafiltração		Diálise	
	$\mu(-)$	pH	ρ (g/mL)	PT (mg/mL)	$\mu(-)$	pH	$\mu(-)$	pH
Coroa	1,33250	5,20	0,9858	0,031	1,33350	3,77	1,33320	6,06
Casca	1,33575	4,15	0,9894	0,141	1,33325	5,00	1,33325	4,42
Talo	1,34050	4,00	1,0092	0,101	1,33395	3,70	1,33340	3,84

Fonte: Autores, 2022

Em relação ao pH, observou-se que as bromelinas devem estar com carga superficial positiva, considerando-se o ponto isoelétrico de 4,6 a 10 (9,5 para a bromelina presente no talo). A presença de carga líquida na superfície da

bromelina evita a precipitação porque aumenta a repulsão entre as macromoléculas. As bromelinas presentes na casca e na coroa, por outro lado, devem estar próximas de seu ponto isoelétrico, o que pode favorecer sua atividade enzimática.

Com relação à densidade, os dados obtidos confirmam o resultado do índice de refração, sendo que a amostra do talo é a que apresenta maiores valores, conforme esperado. Isto pode ser atribuído a uma maior concentração de açúcares nesta fração do abacaxi. Os permeados do talo, no entanto, apresentam redução no teor de sólidos dissolvidos, indicando a possibilidade de retenção de açúcares na membrana, embora as membranas retenham idealmente macromoléculas, o que pode ser um indício de polarização de concentração nas membranas.

Para o teor de proteína total (PT), verifica-se que a maior concentração obtida foi para o extrato da casca, 0,141 mg/mL, seguido pelo talo, 0,101 mg/mL, e pela coroa, 0,031 mg/mL. Novos ensaios devem ser realizados com esta fração, para confirmar o elevado valor de proteína total (40 % maior do que no talo) e avaliar outros tipos de aplicação para esta amostra, caso a proteína presente não seja a bromelina. O valor reportado por Simões *et al.* (2021) para uma mistura das 3 frações do abacaxi foi de 0,124 mg/mL, mesma faixa obtida neste estudo.

Avaliados como um todo, os resultados de caracterização físico-química da alimentação (permeado da MF) estão de acordo com valores obtidos em trabalhos semelhantes da literatura, muito embora nestes trabalhos os resíduos da casca, coroa e talo tenham sido misturados para avaliação (NOR *et al.*, 2016; SIMÕES *et al.*, 2021). Com relação aos permeados de UF e de diálise, houve uma diminuição do índice de refração conforme citado anteriormente, provavelmente devido à retenção de substâncias solúveis no concentrado pela polarização de concentração. No caso da diálise, o grande volume da solução dialisante, comparada com a alimentação 1000:15, reforça os resultados obtidos. Já em relação ao pH, a presença de ácidos como o cítrico e outras substâncias com caráter ácido ou básico devem

explicar a oscilação, indicando uma possível presença de reações entre as moléculas com o tempo. A menor variação de pH foi obtida pelo permeado da diálise, dado o grande fator de diluição empregado.

Os resultados das propriedades de transporte (fluxo e coeficiente de rejeição) são apresentados na Tabela 2. Os dados de rejeição para a microfiltração e de fluxo permeado para a diálise não foram determinados por não serem o foco do trabalho. No caso da microfiltração, esperava-se remover células e material em suspensão, de modo que as proteínas totais e a bromelina, em especial, deveriam permear através da membrana. Desta forma, a microfiltração foi utilizada como pré-tratamento da alimentação.

Este pré-tratamento foi responsável por remover sólidos em suspensão, de modo que o resultado obtido foi uma diminuição na turbidez do extrato. Além disso, a microfiltração com membrana de 0,22 µm promoveu a esterilização da solução, o que aumentou o tempo de processamento da solução e também reduziu significativamente as demandas sobre as membranas de diálise e de ultrafiltração. Cumpre destacar que a microfiltração foi conduzida em modo de permeação frontal, caracterizada por um maior depósito de sólidos sobre a superfície da membrana do que o modo tangencial, o que reduziu significativamente o fluxo permeado com o tempo. Embora esta não seja a configuração ideal para os testes, como o objetivo foi comparar os desempenhos de ultrafiltração e diálise, esta etapa será otimizada em ensaios futuros.

Já em relação à diálise, foi utilizado 1 L de solução dialisante (água destilada) para cerca de 15 mL da alimentação, em um tempo total de 17 horas (equilíbrio). Portanto, a variação volumétrica foi muito pequena para ter sido avaliada, de modo que apenas a rejeição foi considerada para estes testes.

Tabela 2: Fluxo permeado e coeficiente de rejeição para os processos de microfiltração, ultrafiltração e diálise.

	Microfiltração	Ultrafiltração		Diálise
	J (L/m ² h)	J (L/m ² h)	R (-)	R (-)
Coroa	3140	1000	0,65	0,99
Casca	1130	832	0,46	0,79*
Talo	367	200	0,35	0,70

* Determinado a partir do teor de proteína total e não de bromelina, considerando os desvios experimentais.

Fonte: Autores, 2022

A etapa de ultrafiltração foi realizada com modo de operação frontal, em que o concentrado é acumulado na superfície da membrana, o que geralmente leva a fluxos mais baixos do que a operação com escoamento tangencial. O escoamento tangencial é mais adequado, favorecendo a limpeza da membrana na medida em que a solução atravessa o módulo. Entretanto, de um modo geral, os valores dos fluxos de MF e UF foram altos, provavelmente devido ao baixo teor de sólidos suspensos na MF e de sólidos dissolvidos na UF. Além disso, o pré-tratamento da alimentação com a MF aumentou o fluxo de UF.

O fluxo permeado para a MF do extrato da coroa foi baixo, provavelmente devido à maior presença de sólidos suspensos. Ainda para esta amostra, o elevado fluxo de UF indica a presença de uma solução muito diluída, conforme a caracterização físico-química, ou ainda algum defeito na membrana, que pode ter se rompido durante o ensaio. Já em relação às demais amostras, observou-se fluxos de MF e UF de acordo com o esperado: o primeiro valor de fluxo maior do que o segundo, considerando o tamanho dos poros e a porosidade destas membranas.

Em relação às membranas inorgânicas, se considerarmos uma conversão de 1 kg igual a 1 L, o fluxo obtido neste trabalho é maior do que membranas de zircônia de 10 kDa em módulo tubular de 6,2 kg/m²h (NOR *et al.*, 2016). Estes resultados mostram o potencial de aplicação das membranas poliméricas, ainda que utilizadas em sistemas cuja polarização de concentração é maior. Deve-se ressaltar, sobretudo, o baixo custo das membranas poliméricas quando comparadas com membranas inorgânicas, como as de óxido de zircônio, além da facilidade da rota de preparo destas membranas, usualmente a inversão de fases.

No trabalho de Simões *et al.* (2021), os valores de fluxo obtidos por meio da membrana de 3 kDa variaram de 17 L/m²h a 36 L/m²h. Embora a comparação seja prejudicada pela diferença entre a massa molar de corte daquelas membranas com as obtidas neste trabalho, os maiores valores de fluxo reportados aqui indicam melhorias nas propriedades de transporte.

Avaliados como um todo, os valores de fluxo através das membranas de UF de 10 kDa indicam resultados muito promissores, considerando as possibilidades de melhorias hidrodinâmicas nas celas de permeação, como a adoção de

escoamento tangencial e aumento da velocidade de escoamento.

Já em relação ao coeficiente de rejeição, esperava-se uma rejeição próxima de 1 em ambos os ensaios, considerando a faixa de massa molar da bromelina (20 kDa a 31 kDa), em comparação às massas molares de corte das membranas de diálise e ultrafiltração (14 kDa e 10 kDa). Observou-se que os maiores valores de rejeição foram obtidos para a membrana de diálise, que possui um diâmetro de corte maior (14 kDa) em comparação com a membrana de UF (10 kDa). Talvez isso possa ser explicado pela menor força motriz empregada, diferença de concentração, e/ou por uma maior regularidade no tamanho dos poros, com baixa faixa de variação. Cabe destacar que a diálise foi utilizada com grande excesso de solução dialisante, o que favoreceu a separação do ponto de vista hidrodinâmico, mas também promoveu a diluição do sistema como um todo, o que pode implicar em uma etapa adicional de concentração ao final do processo de purificação. Ainda assim, deve-se considerar o tipo de aplicação da bromelina purificada. Estágios de secagem podem produzir uma substância mais pura, com um aumento significativo do custo para remoção da água, enquanto aplicações da bromelina em solução aquosa podem reduzir significativamente o custo e favorecer a comercialização da enzima.

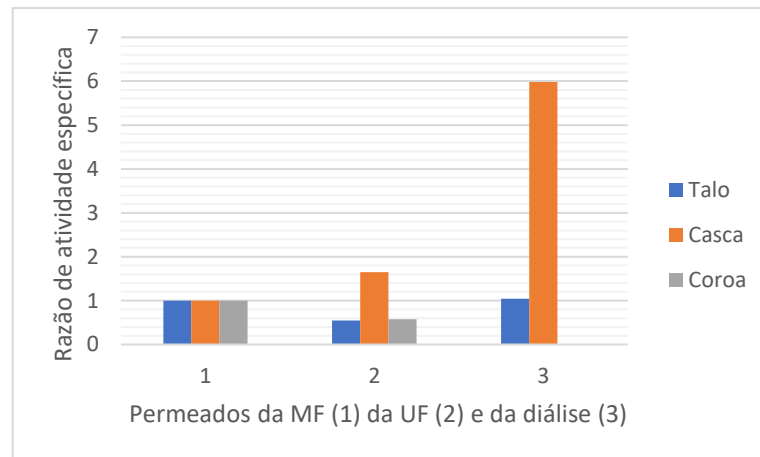
No caso da UF, a aplicação da diferença de pressão como força motriz pode ter ajudado a reduzir a rejeição, já que os poros das membranas têm uma distribuição de tamanhos, que pode estar em uma faixa mais ampla de distribuição de tamanhos comparados à diálise. Também deve-se considerar uma possível deformação dos poros durante os ensaios, dada a deposição de material e aumento da pressão de permeação durante os testes. Ainda assim, os resultados de coeficiente de rejeição obtidos para a bromelina indicaram que a maior rejeição foi encontrada para a amostra da coroa, seguida pela casca e pelo talo. A amostra da coroa não tinha indicado grande valor de sólidos dissolvidos, mostrando que provavelmente o teor de substâncias solúveis em água nesta fração é pequena. Com relação à casca, os resultados mostraram elevado teor de proteína total nesta corrente, indicando ser uma fração com potencial para aprofundamento dos estudos. Quase 50 % da bromelina conseguiu permear pela membrana, indicando que talvez uma membrana

com uma massa molar de corte menor, como 3 kDa seja mais promissora. Para o talo, a rejeição mais baixa pode estar relacionada com a menor massa molar das enzimas com propriedades proteolíticas. A presença de outras substâncias solúveis nesta corrente, identificadas pelo elevado teor de sólidos dissolvidos, pode ser indicio de

utilização deste permeado em outras etapas, como fonte de açúcares e/ou proteínas.

Os resultados de atividade específica da bromelina nos permeados são apresentados na Figura 2. Utilizou-se como referência o valor obtido no permeado da microfiltração para avaliar o aumento ou queda desta propriedade.

Figura 2: Resultados da atividade específica de bromelina nos permeados de MF, UF e diálise



Fonte: Autores, 2022

De um modo geral, para a diálise, em comparação com o permeado da MF, observou-se manutenção da atividade da amostra do talo, aumento significativo da atividade da casca e diminuição da atividade específica da coroa. Muito embora, conforme mencionado anteriormente, para a diálise tenha havido uma diluição significativa, os resultados foram promissores para as proteínas da casca e do talo. Os resultados obtidos para a coroa, por se tratarem de soluções muito diluídas, não são promissores.

Com relação à atividade específica da bromelina no permeado de UF, observou-se que a amostra do talo teve redução pela metade e que o valor obtido para a casca aumentou 1,4 vezes. Isso pode indicar uma maior resistência das enzimas da casca a um aumento de pressão, enquanto a bromelina do talo seria mais sensível a uma diferença de concentração. Estes resultados indicam que novos ensaios são necessários para verificar o efeito das condições do teste na recuperação de bromelina e aproveitamento das diversas correntes em outras etapas de processamento.

A atividade específica das correntes de concentrado não foi determinada ainda, mas deverá ser comparada com os permeados obtidos.

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicaram que o uso da filtração convencional seguida da microfiltração são pré-tratamentos importantes para adequação dos extratos do resíduo de abacaxi. Por meio destes pré-tratamentos foi possível remover sólidos suspensos e bactérias das soluções, permitindo maiores fluxos nas etapas seguintes.

A proporção de 1:3 em massa de resíduo em relação à água revelou que o sistema estava bastante diluído, assemelhando-se às propriedades da água, mas de relevância para as etapas de separação, minimizando a polarização de concentração e a incrustação. Uma otimização da quantidade de água adicionada é importante, especialmente em aplicações em que a bromelina seja comercializada seca. Por outro lado, o teor de água utilizado neste estudo favoreceu as diversas etapas de separação.

As elevadas concentrações de proteína total na casca e no talo indicaram que estas frações são mais promissoras para recuperação de proteínas totais e bromelina, em particular, especialmente comparadas com a fração da coroa. Em relação à atividade específica, os permeados de microfiltração indicaram o mesmo valor tanto para

os resíduos da casca quanto do talo e da coroa.

Tanto a ultrafiltração quanto a diálise são alternativas promissoras para a recuperação de bromelina, sendo que os resultados de UF foram mais expressivos, dada a elevada diluição ocorrida na rota da diálise. Não foi identificado um desempenho significativo comparando as diferentes forças motrizes dos processos de ultrafiltração e de diálise. Entretanto, vale destacar o aumento na atividade específica das enzimas da casca tanto na ultrafiltração quanto na diálise, de 1,4 e de 6 vezes comparados à alimentação.

Financiamento da pesquisa

Esta pesquisa foi financiada pela Fapemig (APQ-02332-21).

Agradecimentos

Os autores agradecem à UFMG, PRPq/UFMG, CNPq, e à Fapemig pelo desenvolvimento da pesquisa.

REFERÊNCIAS

ABREU, D. C. A.; FIGUEIREDO, K. C. S. Bromelain separation and purification processes from pineapple extract. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, p. 1029-1039, apr./jun. 2019.

ARSHAD, Z. I. M. *et al.* Bromelain: An overview of industrial application and purification strategies. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 7283-7297, jun. 2014.

BAN-KOFFI, L.; HAN, Y. W. Alcohol production from pineapple waste. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 6, p. 281-284, sep. 1990.

BHUI, K. *et al.* Bromelain inhibits COX-2 expression by blocking the activation of MAPK regulated NF-kappa B against skin tumorigenicity triggering mitochondrial death pathway. **Cancer Letters**, v. 28, p. 167-176, sep. 2009.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, may. 1976.

COLLETTI, A. *et al.* Recent advances and insights into bromelain processing, pharmacokinetics and therapeutic uses. **Applied Sciences (Switzerland)**, MDPI, 1 set. 2021.

GAMARRA, F. M. C. *et al.* High Retention and Purification of Bromelain Enzyme (Ananas comosus L. Merrill) from Pineapple Juice Using Plain and Hollow Polymeric Membranes Techniques. **Polymers**, v. 14, n. 2, jan. 2022.

GIL, L.; MAUPOEY, P. F. An integrated approach for pineapple waste valorisation. Bioethanol production and bromelain extraction from pineapple residues. **Journal of Cleaner Production**, v. 172, p. 1224–1231, jan. 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal**. 2022.

NOR, M. Z. M. *et al.* Characteristic properties of crude pineapple waste extract for bromelain purification by membrane processing. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 11, p. 7103–7112, 1 nov. 2015.

NOR, M. Z. M. *et al.* Separation of bromelain from crude pineapple waste mixture by a two-stage ceramic ultrafiltration process. **Food and Bioproducts Processing**, v. 98, p. 142–150, jan. 2016.

NOR, M. Z. M. *et al.* Performance of a two-stage membrane system for bromelain separation from pineapple waste mixture as impacted by enzymatic pretreatment and diafiltration. **Food Technology and Biotechnology**, v. 56, n. 2, p. 218–227, jun. 2018.

NOVAES, L. C. *et al.* Stability, purification, and applications of bromelain: A review. **Biotechnology Progress**, v. 32, n. 1, p. 5–13, jan./feb. 2016.

RODA, A. *et al.* Effect of pre-treatments on the saccharification of pineapple waste as a potential source for vinegar production. **Journal of Cleaner Production**, v. 112, p. 4477–4484, jul. 2016.

SIMÕES, A. L. A. *et al.* Bromelain recovery from pineapple subproducts by ultrafiltration and aqueous biphasic systems: processes comparison

and integration. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 39, p. 175-181, nov. 2021.

UPADHYAY, A.; LAMA, J. P.; TAWATA, S. Utilization of Pineapple Waste: A Review. Journal of Food Science and Technology Nepal, v. 6, p. 10-18, jan. 2010.