

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO RECURSOS GENÉTICOS
VEGETAIS

ÍNGARA KEISLE SÃO PAULO BARRETTO MIRANDA

OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO* DE BROMELINA DE DIFERENTES PARTES DE ABACAXIZEIROS

FEIRA DE SANTANA - BA

2014

ÍNGARA KEISLE SÃO PAULO BARRETTO MIRANDA

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE
ANTITUMORAL *IN VITRO* DE BROMELINA DE
DIFERENTES PARTES DE ABACAXIZEIROS**

FEIRA DE SANTANA - BA

2014

ÍNGARA KEISLE SÃO PAULO BARRETTO MIRANDA

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE
ANTITUMORAL *IN VITRO* DE BROMELINA DE
DIFERENTES PARTES DE ABACAXIZEIROS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientadora: Prof^a Dr^a Sandra Aparecida de Assis
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Fernanda Vidigal Duarte Souza

FEIRA DE SANTANA - BA

2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hugo Neves Brandão

Profª. Drª. Elinalva Maciel Paulo

Profª. Drª. Sandra Aparecida de Assis
Orientadora e Presidente da Banca

FEIRA DE SANTANA - BA

2014

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

M642o Miranda, Íngara Keisle São Paulo Barretto
Obtenção, caracterização e atividade antitumoral *in vitro* de bromelina de diferentes partes de abacaxizeiros / Íngara Keisle São Paulo Barretto Miranda. – Feira de Santana, 2014.
78 f.
Orientadora: Sandra Aparecida de Assis.
Co-orientadora: Fernanda Vidigal Duarte Souza.

Mestrado (dissertação) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2014.

1. Bromelina - Abacaxi - Aspectos terapêuticos. 2. Melanoma.
I. Assis, Sandra Aparecida de, orient. II. Souza, Fernanda Vidigal Duarte. III. Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Título.

CDU: 582.564

**À ciência,
para que esses artigos sejam mais uma gota no oceano de conhecimentos.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por traçar o meu caminho e me surpreender com tantas bênçãos à beira da estrada.

Aos meus pais, os quais, abrindo mão de suas vidas, se dedicaram para dar-me um futuro e, em tudo, me ofereceram muito mais do que aquilo que receberam.

A Sinho, esposo e maior amigo, que me incentivou, apoiou, consolou, e esteve presente em todos momentos desta conquista.

Aos meus sogros que, como pais, torceram em cada momento pela minha vitória.

À minha sogra, em especial, pela correção da Língua Portuguesa.

À FAPESB que, através da bolsa a mim concedida, me oportunizou a dedicação exclusiva aos estudos.

Ao PPGRGV pela oportunidade de participar do programa.

Ao professor Luciano, pela realização das análises estatísticas dos dados.

Ao colega Anderson, da FIOCRUZ, pela realização dos testes biológicos.

À professora Sandra, que tem me acompanhado desde a Iniciação Científica e com quem tenho aprendido e crescido há 6 anos; obrigada por confiar em mim e por abrir as portas para o meu crescimento profissional.

Aos colegas do Laboratório de Enzimologia, que torceram pelo sucesso do meu trabalho.

“O temor do Senhor é a chave do conhecimento”

Provérbios 7:1a

RESUMO GERAL

A bromelina é um complexo enzimático de grande importância terapêutica, atribuída tanto à sua atividade proteolítica, como aos componentes não proteolíticos contidos no extrato. Dessa forma, a enzima foi extraída de diferentes partes de *Ananas comosus* var *comosus*, a partir de dois abacaxizeiros com identificações distintas: BGA 771 e BGA 772. Foram investigadas as atividades proteolítica e específica da bromelina de cada parte (caule, coroa, casca, polpa e folha), bem como suas características cinéticas através da medida da temperatura e do pH ótimos, investigando-se, por fim, o seu efeito *in vitro* sobre células tumorais de melanoma murino B16F10. No BGA 771, a maior atividade proteolítica foi encontrada no caule (81,10 µg/mL/min), enquanto a maior atividade específica foi encontrada na polpa e na casca (1983,44 e 1822,33 UA/mg de bromelina, respectivamente). De um modo geral, a temperatura ótima variou entre as partes de 50 a 80 °C e o pH ótimo entre 6 e 8. A bromelina de todas as partes foi eficaz em inibir a proliferação das células de melanoma B16F10 após 48 horas em mais de 50%, sendo a da coroa a mais significativa, com 72,86% de inibição, tendo sido observada uma atividade tempo-dependente. No BGA 772, as maiores atividades foram encontradas na polpa (35,58 µg/mL/min e 1446,60 UA/mg de bromelina). A temperatura ótima nos extratos variou entre 40 e 90°C, enquanto o pH 6 foi o melhor para todas as partes, exceto para a folha que teve dois pontos ótimos: 6 e 8. Somente a bromelina da casca foi capaz de inibir a proliferação do melanoma B16F10, sendo de 66,37% após 48 horas de contato, tendo sido observada uma atividade dose-dependente.

Palavras chave: protease; abacaxi; atividade antineoplásica; efeito antiproliferativo.

GENERAL ABSTRACT

Bromelain is an enzyme complex with great therapeutic importance attributed both to its proteolytic activity, as the non-proteolytic components in the extract. Thus, the enzyme was extracted from different parts of *Ananas comosus* var *comosus*, from two pineapple with different codes: BGA 771 and BGA 772. The proteolytic and specific activities of bromelain from each part (stem, crown, peel, pulp and leaves) were investigated as well as their kinetic characteristics by measuring the optimum temperature and the optimum pH, and finally was studied its effect *in vitro* on murine melanoma B16F10 cells. In BGA 771, the highest proteolytic activity was found in the stem (81.10 mg/mL/min), while the highest specific activity was found in the pulp and peel (1983.44 and 1822.33 UA/mg of bromelain, respectively). In general, the optimum temperature varied between of 50 to 80 °C and pH between 6 and 8. Bromelain all parts were effective more than 50% in inhibiting the melanoma B16F10 cells proliferation after 48 hours. The most significant inhibition was found on crown bromelain with 72.86%, and a time-dependent effect was observed on crown bromelain. At BGA 772 the higher activity was found in the pulp (35.58 mg/mL/min and 1446.60 UA/mg bromelain). The optimum temperature in the extracts ranged between 40 and 90 °C, while the pH 6 was the best for all parties, while the leaf bromelain had two great points: 6 and 8. Only the bromelain peel was able to inhibit the melanoma B16F10 proliferation of, being 66.37% after 48 hours of contact, and a dose-dependent activity was observed.

Keywords: protease; pineapple; antineoplastic activity; antiproliferative effect.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO GERAL

GENERAL ABSTRACT

INTRODUÇÃO GERAL 1

CAPÍTULO 1

BROMELINA: PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS, FARMACOLÓGICAS E APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS

1. Abacaxi: principal fonte de bromelina	4
2. Bromelina e suas propriedades bioquímicas	5
3. Importância biotecnológica	7
4. Propriedades farmacológicas e aplicações terapêuticas	8
4.1 Sistema circulatório, coagulação e fibrinólise	9
4.2 Inflamação e imunomodulação	10
4.3 Desbridamento e cicatrização de feridas	12
4.4 Edema	13
4.5 Absorção de fármacos	14
4.6 Atividades antimicrobiana e antiparasitária	14
4.7 Atividade antineoplásica	15
4.8 Outros efeitos	19
4.9 Aspectos farmacocinéticos e toxicológicos da bromelina	19
REFERÊNCIAS	21

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA E EFEITO INIBITÓRIO *IN VITRO* DA BROMELINA DE *Ananas comosus var comosus* BGA 771 EM CULTURA DE MELANOMA B16F10

RESUMO 27

ABSTRACT 27

INTRODUÇÃO 28

2. MATERIAIS E MÉTODOS	28
2.1 Obtenção da matéria-prima	28
2.2 Obtenção da bromelina	29
2.3 Determinação da atividade proteolítica	29
2.3.1 Preparo do Reagente de Bradford (1976)	31
2.3.2 Curva padrão de proteína	31
2.4 Caracterização cinética	31
2.4.1 Determinação da temperatura ótima	31
2.4.2 Determinação do pH ótimo	32
2.5 Preparo das soluções tampão	32
2.6 Análises estatísticas	33
2.7 Atividade da bromelina em células de melanoma B16F10	33
2.7.1 Avaliação dos efeitos da bromelina sobre o crescimento de culturas de células de melanoma murino B16F10	33
2.7.2 Determinação da quantidade de proteína total utilizada nos meios de cultura	34
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
3.1 Determinação da atividade enzimática nos extratos	34
3.2 Caracterização cinética	36
3.2.1 Temperatura ótima	36
3.2.2 pH ótimo	38
3.3 Atividade da bromelina em células de melanoma B16F10	40
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
REFERÊNCIAS	43

CAPÍTULO 3

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA BROMELINA DE DIFERENTES PARTES DE *Ananas comosus* var *comosus* BGA 772 E SUA ATIVIDADE *IN VITRO* EM CULTURA DE MELANOMA B16F10

RESUMO	46
ABSTRACT	46
INTRODUÇÃO	47

2. MATERIAIS E MÉTODOS	47
2.1 Obtenção da matéria-prima	47
2.2 Obtenção da bromelina	48
2.3 Determinação da atividade proteolítica	48
2.3.1 Preparo do Reagente de Bradford (1976)	50
2.3.2 Curva padrão de proteína	50
2.4 Caracterização cinética	50
2.4.1 Determinação da temperatura ótima	50
2.4.2 Determinação do pH ótimo	51
2.5 Preparo das soluções tampão	51
2.6 Análises estatísticas	52
2.7 Atividade da bromelina em células de melanoma B16F10	52
2.7.1 Avaliação dos efeitos da bromelina sobre o crescimento de culturas de células de melanoma murino B16F10	52
2.7.2 Determinação da quantidade de proteína total utilizada nos meios de cultura	53
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
3.1 Determinação da atividade enzimática nos extratos	53
3.2 Caracterização cinética	55
3.2.1 Temperatura ótima	55
3.2.2 pH ótimo	57
3.3 Atividade da bromelina em células de melanoma B16F10	59
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
REFERÊNCIAS	62
CONCLUSÃO GERAL	64

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Partes de *Ananas comosus* var *comosus* BGA 771. (A) 29
Abacaxizeiro; (B) Fruto, coroa, caule; (C) Folhas.
- Figura 2.** Esquema utilizado para os cálculos da absorvância de caseína 30
consumida na reação enzimática
- Figura 3.** (A) atividade proteolítica e (B) atividade específica do caule, da 35
coroa, da casca, da polpa e das folhas de *Ananas comosus* var *comosus*
BGA 771
- Figura 4.** Variação da atividade proteolítica da bromelina de diferentes 37
partes de *Ananas comosus* var *comosus* BGA 771 frente às variações da
temperatura de reação de 30 a 90°C
- Figura 5.** Variação da atividade proteolítica da bromelina de diferentes 39
partes de *Ananas comosus* var *comosus* BGA 771 frente às variações do pH
de reação de 5 a 9
- Figura 6.** Efeito da bromelina das diferentes partes do abacaxizeiro *Ananas* 40
comosus var *comosus* BGA 771 sobre o crescimento de culturas de células
de melanoma B16F10 após 24 h (A) e 48 h (B)

CAPÍTULO 3

- Figura 1.** Partes de *Ananas comosus* var *comosus* BGA 772. (A) 48
Abacaxizeiro; (B) Fruto, coroa, caule; (C) Folhas
- Figura 2.** Esquema utilizado para os cálculos da absorvância de caseína 49
consumida na reação enzimática
- Figura 3.** (A) atividade proteolítica e (B) atividade específica do caule, da 54
coroa, da casca, da polpa e das folhas de *Ananas comosus* var *comosus*
BGA 772
- Figura 4.** Variação da atividade proteolítica da bromelina de diferentes 56
partes de *Ananas comosus* var *comosus* BGA 772 frente às variações da
temperatura de reação de 30 a 90°C
- Figura 5.** Variação da atividade proteolítica da bromelina de diferentes 58
partes de *Ananas comosus* var *comosus* BGA 772 frente às variações do pH
de reação de 5 a 9
- Figura 6.** Efeito da bromelina das diferentes partes do abacaxizeiro *Ananas* 59
comosus var *comosus* BGA 772 sobre o crescimento de culturas de células
de melanoma B16F10 após 24 h (A) e 48 h (B).

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Preparo das soluções tampão	32
Tabela 2. Atividade proteolítica, atividade específica e quantidade de bromelina presente na reação dos extratos de <i>Ananas comosus</i> var <i>comosus</i> BGA 771	34
Tabela 3. Atividade proteolítica da bromelina em cada parte de <i>Ananas comosus</i> var <i>comosus</i> BGA 771 frente às variações de temperatura	37
Tabela 4. Atividade proteolítica da bromelina em cada parte de <i>Ananas comosus</i> var <i>comosus</i> BGA 771 frente às variações de pH	38
Tabela 5. Porcentagem de inibição da proliferação de culturas de células de melanoma B16F10 após 24 h e 48 h sob a exposição da bromelina de <i>Ananas comosus</i> var <i>comosus</i> BGA 771	40
Tabela 6. Concentração de proteína total da bromelina de <i>Ananas comosus</i> var <i>comosus</i> BGA 771 nos meios de cultura de melanoma	41

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Preparo das soluções tampão	51
Tabela 2. Atividade proteolítica, atividade específica e quantidade de bromelina presente na reação dos extratos de <i>Ananas comosus</i> var <i>comosus</i> BGA 772	53
Tabela 3. Atividade proteolítica da bromelina em cada parte de <i>Ananas comosus</i> var <i>comosus</i> BGA 772 frente às variações de temperatura	56
Tabela 4. Atividade proteolítica da bromelina em cada parte de <i>Ananas comosus</i> var <i>comosus</i> BGA 772 frente às variações de pH	58
Tabela 5. Porcentagem de inibição da proliferação de culturas de células de melanoma B16F10 após 24 h e 48 h sob a exposição da bromelina de <i>Ananas comosus</i> var <i>comosus</i> BGA 772	60
Tabela 6. Concentração de proteína total da bromelina de <i>Ananas comosus</i> var <i>comosus</i> BGA 772 nos meios de cultura de melanoma B16F10	60

INTRODUÇÃO GERAL

A bromelina é um complexo enzimático constituído, principalmente, por proteases e obtido a partir dos tecidos vegetais de abacaxizeiro, bem como de outros representantes da família Bromeliaceae. Tem seu aproveitamento ligado a inúmeras aplicações, especialmente terapêuticas, que são atribuídas tanto à sua atividade proteolítica, como a de outros componentes do extrato. Suas atividades terapêuticas têm sido descritas desde 1988 quando Taussing e Batkin revisaram o tema, reportando tanto observações anedóticas, como outras comprovadas em trabalhos anteriores.

Sua gama de aplicações abrange a indústria de alimentos, no amaciamento de carne, clarificação de bebidas, produção de hidrolisados de proteína, etc., a indústria têxtil e de couro, a de cosméticos (BALA et al, 2012) e, especialmente, a indústria farmacêutica, tendo inúmeras atividades terapêuticas relatadas. Suas ações biológicas descritas são: fibrinolítica, anti-inflamatória, anticoagulante, imunomoduladora, desbridante de ferimentos e queimaduras, antiedematosa, antineoplásica, bem como aumento da absorção de antibióticos, dentre outros (BROMELAIN, 2010).

A casca, a medula do fruto, o caule, a coroa e as folhas representam cerca de 50% do peso total do abacaxizeiro, sendo que o aumento da produção de abacaxi eleva, proporcionalmente, a quantidade desses resíduos, os quais, sem um destino adequado, representam sérios problemas ambientais (KETNAWA; CHAIWUT; RAWDKUEN, 2012). Sabendo-se que esses compartimentos do vegetal apresentam quantidades significativas da bromelina, seu aproveitamento para a extração do complexo enzimático torna-se uma alternativa viável, oferecendo um destino apropriado aos rejeitos industriais, além da obtenção de um produto com elevado valor agregado.

Sabe-se que o seu conteúdo na planta pode variar de acordo com inúmeros fatores, dentre eles, a variedade do abacaxi, a origem e o cultivo, sendo, portanto, de suma relevância explorarem-se o conteúdo e as características da bromelina em diferentes abacaxizeiros. Diante disso, o presente trabalho objetivou extrair a bromelina do caule, da casca, da coroa, da polpa e das folhas de abacaxizeiros obtidos da Embrapa (*Ananas comosus* var *comosus*, sendo o BGA 771 e o BGA 772); quantificar as atividades proteolítica e específica

dos extratos obtidos; realizar estudos de caracterização cinética, identificando a temperatura ótima e o pH ótimo para a atividade proteolítica da bromelina em cada extrato, e, por fim, investigar o seu efeito sobre culturas de células de melanoma B16F10.

Este trabalho foi dividido em três capítulos. O primeiro deles traz uma revisão bibliográfica versando sobre as propriedades bioquímicas, farmacológicas e aplicações terapêuticas da bromelina. O segundo traz um estudo experimental realizado com o abacaxi da espécie *Ananas comosus* var *comosus*, obtido da EMBRAPA tendo com identificação local de BGA 771. Este estudo traz as atividades proteolíticas e específicas da bromelina em cada extrato obtido, além de sua caracterização cinética e o seu efeito sobre células tumorais de melanoma murino. O terceiro capítulo traz um estudo semelhante ao do segundo, tendo sido usada a mesma espécie de abacaxizeiro, porém com código local diferente, sendo o BGA 772.

CAPÍTULO 1

BROMELINA: PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS, FARMACOLÓGICAS E APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS

1. Abacaxi: principal fonte de bromelina

O abacaxi, de nome científico *Ananas comosus* L. Merrill, família Bromeliaceae, tem sua origem documentada no continente americano, mais especificamente no Brasil e Paraguai. A Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical possui um Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Abacaxi com mais de 800 acessos de diferentes espécies (*Ananas comosus*, *A. bracteatus*, *A. lucidus*, *A. ananassoides*, *Ananas paraguayensis*, *Ananas nanus*, *A. sp.*, *A. fritzmuellere*, *Pseudoananas sagenarius*, *Bromelia sp.*, *B. laciniosa*, *B. balansae*, *B. goeldiana*, *B. caratas*, *Tillandsia sp.*, *Bilbergia sp.*, *Dickia sp.*, *Aechmea mertensii*) (EMBRAPA, 2014).

A história da bromelina está ligada à do abacaxi, o qual foi encontrado por Colombo em 1493 em Guadalupe, onde era usado na medicina popular para curar diferentes doenças dos habitantes da América Central e do Sul, sendo, posteriormente, descoberto que essa importância era devida à presença da bromelina (TAUSSIG; BATKIN, 1988).

Simplificadamente, bromelina é o extrato aquoso bruto obtido do caule e do fruto do abacaxi (ORSINI, 2006). Em um conceito mais amplo, é um complexo enzimático proteolítico encontrado nos diferentes tecidos das plantas da família Bromeliaceae, da qual a *Ananas comosus* L. Merrill é a fonte mais conhecida. Os resíduos do abacaxi (coroa, casca e folha) contêm menores quantidades quando comparados com caule e fruto, sendo a bromelina do caule (E.C. 3.4.22.32) e a do fruto (E.C. 3.4.22.33) disponíveis comercialmente (KETNAWA; CHAIWUT; RAWDKUEN, 2011). Para Maurer (2001) e Pavan (2012) bromelina é uma mistura de tiol-endopeptidases e outros componentes como: fosfatases, glicosidades, peroxidases, celulases, escarases, glicoproteínas, carboidratos, e muitos inibidores de proteases. Suas ações farmacológicas são atribuídas, somente em parte, às proteases, podendo, portanto, os demais constituintes, ter importância terapêutica (MAURER, 2001).

A proporção de cada um dos componentes na planta pode variar de acordo com a composição do solo, condições climáticas, estágio de desenvolvimento, localização geográfica, variedade do abacaxi e o processo de extração, sendo que esses fatores podem contribuir para as variações das atividades farmacológicas da bromelina (TAUSSING; BATKIN, 1988; TOCHI et al., 2008).

Diante disso, para a extração da bromelina, torna-se interessante o uso de abacaxizeiros de variedades conhecidas e cujo cultivo seja padronizado, a fim de se minimizar as variações dos componentes ativos, como é o caso dos acessos disponíveis no BAG da EMBRAPA, ou mesmo, de variedades cultivadas em micropropagação *in vitro*, como se tem abordado atualmente em alguns trabalhos como os de Leite e cols. (2012) e Vilanova Neta e cols. (2012).

A bromelina é preparada a partir do suco fresco do abacaxi, seguindo-se a centrifugação, a ultrafiltração e a liofilização, obtendo-se um pó amarelado; as preparações comerciais são avaliadas quanto a sua atividade proteolítica (MAURER, 2001), que é determinada usando-se diferentes substratos proteicos, como: caseína, gelatina, albumina, hemoglobina, etc.

A bromelina é categorizada como aditivo de alimento pela Food and Drug Administration (2013) e está na lista de substâncias reconhecidas como seguras, disponível para o público na forma de pó, creme, comprimido ou cápsula, sendo encontrada, tanto na sua forma purificada, como em associação com outras enzimas na mesma formulação (ORSINI, 2006).

2. Bromelina e suas propriedades bioquímicas

As propriedades bioquímicas da bromelina, entre as quais, viscosidade, estabilidade, pH e temperatura ótimos, peso molecular, imobilização, modificação química, efeitos de sais e solventes orgânicos (BALA et al., 2012) têm sido estudadas a fim de aumentar suas aplicações industriais e terapêuticas. Tais características não são estáticas, pois cada autor encontra faixas diferentes para esses parâmetros, sendo, portanto, necessário estudá-los em cada amostra de diferente origem.

Segundo Gorodkiewics, Breczko e Sankiewics (2012), a bromelina pertence à superfamília da papaína, mas difere dos demais membros, na sequência de aminoácidos, tendo peso molecular de 23,8 kDa e contendo 212 resíduos de aminoácidos com uma única ligação glicosídica. Já a revisão feita por Bala e cols. (2012) relaciona a caracterização feita por diversos autores, que encontraram bromelina de caule com peso molecular entre 26 e 37 kDa, pH ótimo de 6 a 7, e temperatura ótima de 50 a 60 °C, enquanto a bromelina do fruto

apresentou peso molecular de 24,5 a 32,5 kDa, pH ótimo de 3 a 8 e temperatura ótima de 37 a 70 °C.

O espectro de substratos é amplo, e sua ação proteolítica pode degradar desde amidas e dipeptídeos de baixo peso molecular, até proteínas de alto peso molecular, como fibrina, albumina, caseína, angiotensina II, bradicinina, clivando, preferencialmente, ligações glicil, alanil e leucil (MAURER, 2001).

O conteúdo de bromelina varia de acordo com o grau de maturidade do fruto, tendo sido observado por Chaurasiya e Hebbar (2013) que a atividade enzimática foi ligeiramente maior no fruto parcialmente maduro. Além disso, os mesmos autores observaram que o tampão de extração também interfere na atividade enzimática, tendo sido obtida maior atividade específica no tampão fosfato de sódio, enquanto a temperatura de extração não interfere na atividade proteolítica, podendo ser realizada em temperatura ambiente, ao invés de se usarem baixas temperaturas.

A bromelina pode ser purificada com diferentes graus de pureza, a depender da finalidade da aplicação, seja acadêmica, industrial, terapêutica, etc, e, em cada etapa de purificação, perde-se atividade enzimática, devendo-se optar pelo mínimo de processos, sendo que a escolha do método depende das características da enzima e do grau de pureza desejado (LOPES et al., 2010). A pureza é essencial para investigações da estrutura 3-D e da relação estrutura-atividade de enzimas (BALA et al., 2012).

Por meio de cromatografia líquida rápida de proteínas e outros métodos de purificação, foram isoladas tiol-proteases ácidas e básicas (bromelina de caule, ananás e comosáina) de extratos brutos de bromelina, que compreendem espécies de enzimas da superfamília da papaína com diferentes atividades proteolíticas, massas moleculares entre 20 e 31 kDa e pontos isoelétricos de 4,6 e > 10 (MAURER, 2001).

Diferentes estratégias de purificação vêm sendo empregadas por diversos autores: precipitação (SOARES et al., 2012; SILVESTRE et al., 2012; SILVA et al., 2010; CHAURASIYA; HEBBAR, 2013), extração por micelas reversas (HEBBAR et al., 2012; KUMAR; HEMAVATHI; HEBBAR, 2011; FILETI et al., 2009; CHAURASIYA; HEBBAR, 2013), sistema de duas fases aquosas (KETNAWA; CHAIWUT; RAWDKUEN, 2011; COELHO et al., 2013; KETNAWA et al., 2009), cromatografia (BALA et al., 2012), filtração por membranas (BALA et

al., 2012), e cada uma apresenta rendimentos diferentes, devendo ser estudado o método apropriado para cada caso, de acordo com a necessidade de aplicação da enzima.

Uma estratégia para se melhorar a resistência e vida de prateleira da bromelina é a imobilização. Segundo Bala e cols. (2012), a ligação da enzima em diversos tipos de suporte melhora sua afinidade ao substrato, tornando-a mais resistente à desnaturação, apresentando maior estabilidade térmica e atividade em maiores faixas de pH, quando comparada com a bromelina livre, além de ser mais fácil de ser manipulada e separada dos produtos formados.

3. Importância biotecnológica

As proteases são consideradas as enzimas mais significantes industrialmente, representando cerca de 60% de todas as enzimas comercializadas no mundo, sendo amplamente utilizadas em indústrias de alimento, farmacêutica e de detergente. As proteases de planta mais reconhecidas são a papaína de *Carica papaya*, a ficina de *Ficus spp.* e a bromelina de *Ananas comosus* (BALA et al., 2012).

A bromelina tem uma gama de aplicações tecnológicas, e são reportados estudos com inúmeras abordagens, mais expressamente na área médica e farmacêutica. Segundo revisão de Bala e cols. (2012), tem sido bastante utilizada pela indústria de alimentos no amaciamento de carnes, na produção de hidrolisados de proteína, na clarificação de bebidas, como suplemento alimentar e na prevenção do escurecimento do suco de maçã. Tem sido usada, ainda, como princípio ativo na indústria de cosméticos para *peeling*, na indústria de couro, para o curtimento e amolecimento do material, na indústria têxtil, para melhorar o tingimento das fibras de proteína e decompor as da seda e do *jeans*.

A utilização da bromelina no amaciamento de carne é, há muito, conhecida. Kim e Taub (1995) estudaram a especificidade da papaína e da bromelina na hidrólise de miosina e actina, as duas principais proteínas estruturais da carne. Sonklin, Laohakunjit e Kerdchoechuen (2011) produziram, pela primeira vez, hidrolisado de proteína a partir da degradação de feijão-da-china, utilizando a bromelina com a finalidade de se obter, a partir do hidrolisado, precursores do

processo de aromatização de alimentos, mostrando uma nova abordagem na utilização da enzima.

Zainal e cols. (2013) utilizaram a metodologia de superfície de resposta para a otimização do amaciamento de carne com bromelina. Benucci e cols. (2011) mostraram a potencialidade da aplicação da bromelina na clarificação de vinho. Melendo e cols. (2006) utilizaram a bromelina no amaciamento de linguça. Uma nova abordagem foi adotada por Salampessy e cols. (2010), que utilizaram a bromelina para a produção de peptídeos com atividade antimicrobiana a partir da hidrólise de proteínas insolúveis de *Meuschenia* sp. (uma espécie de peixe). Gorodkiewics, Breczo e Sankiewicz (2012) inovaram ao desenvolverem biosensores para a identificação de cistatina em fluidos biológicos, a partir da imobilização da bromelina, da ficina e da quimiopapaína.

4. Propriedades farmacológicas e aplicações terapêuticas

As principais abordagens descritas para a bromelina são com relação à sua gama de ações e potencialidades terapêuticas. Taussig e Batkin (1988) foram os primeiros a revisar essas aplicações, enfocando suas ações sobre o câncer, sistema circulatório, inflamação e queimaduras de terceiro grau, tópicos, que ainda hoje, são investigados e aprofundados por inúmeros pesquisadores.

Em 2001, Maurer resumiu, numa revisão, as diversas propriedades terapêuticas da bromelina: previne a formação de edema e reduz o já existente; reduz os níveis sanguíneos de fibrinogênio; auxilia a fibrinólise; ativa a plasmina; prolonga o tempo de protrombina e tromboplastina; previne a agregação plaquetária e sua adesão ao endotélio; reduz os níveis sanguíneos de cininas plasmáticas; reduz os níveis de prostaglandina E₂ e de tromboxano A₂ em exsudato durante inflamação aguda; atua como agente anti-inflamatório; induz a secreção de interleucinas Il-1, Il-6, Il-8 e fator de necrose tumoral- α de monócitos e granulócitos; auxilia o processo oxidativo e a citotoxicidade de granulócitos contra células tumorais; aumenta a absorção de antibióticos; previne metástase em modelo animal; promove o desbridamento em queimaduras na pele.

Algumas dessas ações estão relacionadas à sua atividade proteolítica, como inibição da agregação plaquetária e ação anti-inflamatória. Já outras como,

ação antitumoral, antimetastásica e de desbridamento de feridas não estão diretamente ligadas à atividade proteolítica (TAUSSING; BATKIN, 1988).

A bromelina é comercializada na Europa e EUA como anti-inflamatório, agente desbridante para ferimentos, auxiliar da digestão, auxiliar em problemas circulatórios, etc. enquanto, no Brasil, é encontrada livremente nas farmácias como agente expectorante e indicada para tratar de afecções no trato respiratório. A seguir, serão apresentados, mais detalhadamente, as ações e alguns dos mecanismos que dão à bromelina tamanha importância médica.

4.1 Sistema circulatório, coagulação e fibrinólise

A administração de bromelina por via oral pode reduzir os riscos de ataque cardíaco ou acidente vascular cerebral, devido à redução de prostaglandina E_2 e/ou tromboxano A_2 , aumentando, assim, a concentração relativa de prostaciclina I_2 prevenindo, por conseguinte, a formação de trombos; além disso, hidrolisa as placas de colesterol nas paredes das artérias e minimiza os riscos de obstrução dos vasos sanguíneos por trombos (TAUSSING; BATKIN, 1988).

Alguns efeitos da bromelina podem ser resultados de sua capacidade de alterar e modular diferentes estruturas da superfície celular através da clivagem de peptídeos. Assim, há uma modificação das moléculas de adesão celulares, seja nas plaquetas ou em células tumorais, o que inibe sua agregação. A dissolução de constituintes da membrana celular e seu efeito no processo hemostático podem explicar a ação antiedematosa e fibrinolítica da bromelina (MAURER, 2001).

Além disso, os dados referentes à eficácia antiedematosa da bromelina sugerem que os processos hemostáticos estão envolvidos, como o prolongamento do tempo de protrombina e tromboplastina e a redução dos níveis sanguíneos de fibrinogênio, além da redução da agregação plaquetária induzida por ADP (adenosina difosfato, agente agregante) (MAURER, 2001).

Os efeitos da bromelina sobre a agregação plaquetária e sobre as interações das plaquetas com as células endoteliais foram estudados, *in vitro*, por Metzigg et al. (1999). Investigaram, ainda, os efeitos da bromelina por via oral, na formação de trombos *in vivo*. Perceberam que a bromelina preveniu

completamente a agregação plaquetária induzida por trombina *in vitro*, além de reduzir a adesão das plaquetas às células endoteliais bovinas. *In vivo*, a bromelina administrada pelas vias oral e intravenosa, reduziu a formação de trombos em arteríolas e vênulas.

A atividade fibrinolítica foi atribuída ao aumento da conversão de plasminogênio em plasmina, a qual é responsável pela degradação de fibrina (produto da coagulação), levando ao aumento da permeabilidade e à reabsorção do edema para a circulação sanguínea (MAURER, 2001).

4.2 Inflamação e imunomodulação

Segundo Taussing e Batkin (1988), a bromelina tem sido usada como anti-inflamatório desde o tempo em que se tornou disponível como droga, e seu uso abrange artrite reumatoide, tromboflebite, hematoma, inflamações orais, úlceras diabéticas, inflamações retal e periretal, pancadas, e cirurgias plásticas. Em todos os casos, por via oral, reduzindo o edema, a dor, bem como a duração do tempo de cura.

A bromelina reduziu as concentrações de prostaglandina E₂ e substância P, mediadores da resposta imunológica, em exsudatos inflamatórios, de um modelo de inflamação aguda na articulação de joelho em ratos. Sua habilidade em alterar a expressão de moléculas de superfície celular de leucócitos é outro mecanismo descrito (ORSINI, 2006).

O efeito anti-inflamatório da bromelina é, em parte, resultado da inibição da síntese de bradicinina no sítio da inflamação, reduzindo, também, a formação de fibrina, e a migração de leucócitos para as áreas inflamadas, devido à sua habilidade em remover moléculas de superfície celular, prevenindo a firme adesão dos leucócitos nas paredes dos vasos no local da inflamação. Seu potencial em inibir, especificamente, a expressão da ciclo-oxigenase-2, e em reduzir as concentrações de substância P, e as concentrações *in vivo* de prostaglandina E₂, além de seu efeito imunomodulatório (ativação das células *natural killer*, aumento da produção de fator de necrose tumoral- α , interferon- γ e interleucinas) colaboram para sua atividade anti-inflamatória (BROMELAIN, 2010).

Errasti e cols. (2013) compararam o efeito anti-inflamatório do extrato parcialmente purificado de frutos de *Bromelia hieronymi* com o efeito da bromelina em diferentes modelos de inflamação e observaram que doses com atividade proteolítica igual mostraram respostas anti-inflamatórias semelhantes, confirmando que a atividade proteolítica é responsável pela atividade anti-inflamatória.

Segundo Borelli e cols. (2011), a bromelina tem efeitos inibitórios na secreção intestinal e inflamação. Eles investigaram o efeito da bromelina na contratilidade e trânsito intestinal de camundongos, em condições diferentes (motilidade devido à inflamação e ao diabetes). Os resultados mostraram que a bromelina inibiu as contrações induzidas por diferentes agentes espasmogênicos, indicando que é eficaz em inibir a motilidade intestinal, podendo ser um composto para o desenvolvimento de novas drogas, capaz de normalizar a motilidade intestinal durante a inflamação e o diabetes. Possíveis sítios de ação da bromelina incluem: células epiteliais, elementos neuronais e miócitos, nos quais é expresso o PAR-2 (receptor ativado por protease, cuja ativação induz o aumento da concentração de cálcio intracelular). As células contendo PAR-2 podem ser alcançadas pela bromelina através da circulação ou pelo trato gastrointestinal. Fosfolipase C e fosfodiesterase 4 também estão envolvidos na resposta terapêutica.

Wen e cols. (2006) sugerem que a bromelina pode ser benéfica em pacientes com íleo paralítico pós-operatório, ao melhorar o trânsito intestinal em ratos pós-operados. O mecanismo proposto é, em parte, pela inibição da óxido nítrico sintase, enzima cuja ativação é responsável por modular diretamente a dismotilidade intestinal e por iniciar a inflamação intestinal. Para Hale e cols. (2005), o efeito anti-inflamatório da bromelina administrada por via oral, em doença inflamatória intestinal, se deve à atividade proteolítica local, e não, a uma atividade sistêmica.

Aiyegbusi e cols. (2011) compararam o efeito da bromelina e do suco de abacaxi na cicatrização de lesão aguda no tendão de Aquiles. Os resultados mostraram que, embora ambos apresentassem efeito terapêutico, a bromelina se destacou melhor. Outro estudo realizado no mesmo ano por Aiyegbusi e cols., mostrou o efeito da administração diária da bromelina na proliferação de tenócitos e no stress oxidativo, em um modelo experimental de lesão no tendão de Aquiles

de ratos, concluindo que 7 mg/Kg de bromelina por dia promoveu a cicatrização pela estimulação da proliferação celular, podendo, portanto, pode ser uma opção no tratamento de inflamação aguda do tendão.

Fitzhugh e cols. (2008) estudaram o efeito da bromelina na migração de leucócitos para o sítio de inflamação, e os resultados mostraram que a bromelina pode reduzir efetivamente a migração de neutrófilo induzida por Interleucina-8, tanto *in vitro*, como *in vivo*, promovendo a remoção de CD128 (receptor de citocina), constituindo-se potenciais mecanismos de redução da inflamação.

Em 2013, Müller e cols. realizaram o primeiro estudo clínico placebo-controlado randomizado que investigou o efeito da bromelina na atividade de células do sistema imunológico, após ingestão oral por voluntários saudáveis e perceberam que houve modulação das respostas celulares de linfócitos, sendo sugerido que esse efeito decorra, em parte, de sua atividade anti-inflamatória já conhecida.

Segundo Maurer (2001), a bromelina tem sido usada nos EUA e Europa como alternativa ou complemento a terapias com glicocorticoides, anti-inflamatórios não esteroides e agentes imunomoduladores, sendo vantajosa devido a sua baixíssima toxicidade, o que a torna apropriada para controlar inflamações crônicas.

Engwerda e cols. (2001) mostraram a ação imunoestimulante da bromelina, ao evidenciarem, em seu estudo, seu potencial na ativação de respostas inflamatórias em situações deficientes, como ocorre em indivíduos imunocomprometidos. Este efeito ocorreu através da produção de óxido nítrico e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), mediado por estimulação de interferon- γ , e aumentou ainda a produção de Il-2 e Il-12 mediadas pela produção de interferon- γ pelas células *natural killer*.

4.3 Desbridamento e cicatrização de feridas

Wu e cols. (2012) demonstraram que o uso tópico da bromelina, para o desbridamento enzimático de ferimentos, acelerou a reperfusão, a pO_2 (pressão parcial de oxigênio) no tecido, controlou a expressão de TNF- α e aumentou a expressão de TGF- β (fator de transformação do crescimento beta), melhorando o

microambiente do ferimento, e promovendo a cicatrização de ferimento causado por arma de fogo.

Hu e cols. (2011) também demonstraram o efeito da bromelina no desbridamento de ferimento causado por arma de fogo em porcos. Perceberam que uma solução de bromelina (10 mg/mL) hidrolisou rapidamente o tecido ferido com o mínimo de efeito no tecido normal, mostrando vantagens no desbridamento enzimático associado a uma simples incisão no ferimento, no lugar do convencional desbridamento cirúrgico, amplamente usado para desbridar ferimentos de arma de fogo.

Aichele e cols. (2013) estudaram o efeito da bromelina na regeneração tecidual a nível celular, através de ensaio de cicatrização de feridas *in vitro*. Usaram os dois principais modelos de cicatrização de tecidos moles, fibroblastos e células endoteliais microvasculares. Os resultados mostraram que o uso terapêutico da bromelina no tratamento de ferimentos crônicos é muito promissor.

Krieger e cols. (2012) estudaram a implicação da Debrase® (bromelina de uso tópico) para o desbridamento enzimático de queimaduras nas mãos, e os resultados mostraram que houve redução da espessura total da área ferida, além de reduzir a necessidade do uso de enxerto de pele.

4.4 Edema

Muitos estudos mostram a atividade antiedematosa da bromelina. Por exemplo, em um estudo controlado, duplo-cego, a bromelina reduziu o edema em pacientes com traumas de face pós-cirúrgico e não cirúrgico (ORSINI, 2006). Reduziu a formação de edema induzido por carragenina e dextrano, além de ter apresentado melhor efeito antiedematoso do que todas as drogas testadas (indometacina, ácido acetilsalicílico, escina e oxifenilbutazona) (MAURER, 2001).

Em um ensaio clínico, Inchingolo e cols. (2010) demonstraram, claramente, a efetividade da bromelina no tratamento do edema pós-operatório, em exodontia do terceiro molar. Segundo Orsini, (2006) a bromelina pode ser, ainda, de interesse para a cirurgia plástica, devido a sua habilidade em reduzir a dor, o edema, a inflamação e a agregação plaquetária, além de potencializar efeito de antibiótico, tudo isso benéfico para a recuperação pós-operatória.

4.5 Absorção de fármacos

Sabe-se, há muitos anos, que a bromelina é capaz de aumentar a permeabilidade tecidual a penicilinas e tetraciclinas, aumentando a absorção, tanto por via oral, como por via subcutânea ou intramuscular (MAURER, 2001). A bromelina mostrou-se eficaz em aumentar a atividade de antibióticos em crianças com sepse (ORSINI, 2006).

Grabovac e Schnurch (2006) estudaram o efeito da bromelina sobre a permeabilidade intestinal da heparina, quando estas estão complexadas, e os resultados mostraram que o complexo formado é estável, sendo que a atividade proteolítica da bromelina não foi afetada, enquanto a permeação da heparina foi significativamente aumentada.

4.6 Atividades antimicrobiana e antiparasitária

Existem poucos relatos quanto ao uso da bromelina contra parasitas humanos ou animais, sendo encontrados artigos abordando, em sua maioria, os parasitas intestinais, como bactérias e nematoides.

Estudos sugerem que a bromelina pode combater alguns efeitos de patógenos intestinais (*Vibrio cholerae* e *Escherichia coli*), e parece que esta interação decorre do efeito da bromelina nos mecanismos de sinalização da secreção intestinal, incluindo adenosina 3,5-monofosfato cíclico, guanosina 3,5-monofosfato cíclico e cascatas de sinalização cálcio-dependentes. Outro mecanismo proposto é o efeito da bromelina em modificar, proteoliticamente, os sítios de ligação, prevenindo a adesão da *E. coli* na mucosa intestinal (BROMELAIN, 2010).

Chandler e Mynott (1998) mostraram que a bromelina reduziu a incidência de diarreia causada por *Escherichia coli* enterotóxica em leitões, além de ter promovido ganho de peso, comparando-se com leitões não tratados. A patogênese desta cepa decorre de sua ligação com glicoproteínas localizadas nas células da mucosa intestinal, e a bromelina foi capaz de inativar, temporariamente, esses receptores, *in vivo*, e proteger os leitões contra a diarreia causada pelo patógeno. Portanto a bromelina pode ser utilizada como profilaxia

contra *Escherichia coli* enterotóxica em leitões. Além disso, nenhum efeito adverso foi observado. Os autores sugerem a bromelina como uma forma de prevenir diarreia em crianças acometidas com o mesmo patógeno, visto que não há uma vacina ou outra forma eficaz de combater esse problema.

Stepek e cols. (2005) compararam o efeito anti-helmíntico, *in vitro*, de diferentes cisteína-proteases (mamão, abacaxi, kiwi, etc), utilizando o *Heligmosomoides polygyrus*, nematódeo gastrointestinal de roedor, e perceberam que, com exceção da protease do kiwi, todas as outras causaram danos consideráveis à cutícula do parasita. Com base nesses resultados, essas proteases tornam-se potenciais candidatas a uma nova classe de agentes anti-helmínticos. Esses dados corroboram com os achados de Domingues e cols. (2013), que mostraram que o extrato aquoso da casca de abacaxi e a bromelina foram efetivos contra *Haemonchus contortus in vitro*, com menor efeito anti-helmíntico *in vivo* em ovelhas, propondo uma associação com antiácido para melhorar a atividade local da bromelina.

Joshi, Mallinson e Dwyer (2005) estudaram o efeito de diversas proteases (serina-, tiol-, metalo-, e outras proteases) sobre a atividade da fosfatase ácida produzida por *Leishmania donovani* (enzima secretada durante seu crescimento *in vitro* e de importância para a sobrevivência no seu vetor, o flebotomíneo). Dentre onze enzimas testadas, somente a bromelina e a subtilisina reduziram eficazmente a atividade enzimática da fosfatase ácida. A resistência desta enzima a várias substâncias pode prolongar a sua vida funcional dentro do intestino de flebotomíneos e ajudar a facilitar a infecção do parasita neste hospedeiro.

4.7 Atividade antineoplásica

A atividade antineoplásica da bromelina é descrita há muito, sendo explorada por diversos trabalhos, tanto de estudos *in vitro* como *in vivo*, e em diferentes modelos e linhagens de células tumorais. Segundo Chobotova e cols. (2010), observações clínicas e modelos baseados em células sugerem que a bromelina age sistemicamente afetando múltiplas células e alvos moleculares, tendo a capacidade de modular mecanismos que levam à malignidade. Sugerem que a atividade antitumoral da bromelina se deve à sua ação direta nas células

tumorais e no seu microambiente, bem como, à sua capacidade de modulação dos sistemas imune, inflamatório e hemostático. A seguir, estão relacionadas algumas das evidências da atividade antitumoral da bromelina.

A atividade antitumoral já era descrita desde 1988 quando Taussing e Batkin revisaram as propriedades farmacológicas da bromelina. Em seu trabalho, citam que a ação benéfica da bromelina se deve à sua ação desprotetora das células neoplásicas, através da degradação dos coágulos de fibrina que recobrem o tumor e, desta forma, o sistema imune tem melhor acesso às células estranhas. Além da fibrina, as plaquetas também estão associadas à metástase de tumores, e, portanto, a bromelina, com sua ação fibrinolítica e anticoagulante, pode ter interferência relevante sobre a fibrina e coagulação nas células tumorais. Pode ainda aumentar as defesas imunológicas do indivíduo, reduzindo a metástase por aumento dos níveis de prostaciclina. A bromelina, entretanto, é mais efetiva nos estádios de iniciação e desenvolvimento do tumor.

Segundo Maurer (2001), uma ampla faixa de benefícios terapêuticos tem sido atribuída à bromelina. Resultados de estudos pré-clínicos e farmacológicos recomendam a bromelina como uma droga complementar na terapia do câncer, pois age como imunomodulador, aumenta a imunotoxicidade dos monócitos contra células tumorais e induz a produção de citocinas como TNF- α , interleucinas (Il-1 β , Il-6 e Il-8). Presumivelmente, os efeitos da bromelina sobre o câncer são resultados da sua ação sobre o sistema imune, a inflamação, a hemostasia e sobre moléculas de sinalização celular (BROMELAIN, 2010).

Báez e cols. (2007) extraíram a bromelina do caule de abacaxizeiro e testaram sua atividade antitumoral, *in vivo*, contra as seguintes linhagens: leucemia (P-388), sarcoma (S-37), tumor ascítico de Ehrlich, carcinoma pulmonar de Lewis, melanoma (MB-F10) e adenocarcinoma de mama (ADC-755). Após administrações intraperitoneais de bromelina (1; 12,5 e 25 mg/kg), tendo o 5-fluorouracil (5-FU, 20 mg/kg) como controle positivo, os animais tiveram aumento significativo no índice de sobrevivência, exceto para melanoma, sendo o efeito antitumoral maior que o de 5-FU. Além disso, apresentou efeito antimetastásico, e os resultados sugerem que é um efeito independente da ação antitumoral primária.

Em ensaio *in vitro*, a bromelina diminuiu a capacidade das células tumorais de migrarem através da matriz extracelular, e inibiu o crescimento das células

neoplásicas de forma dose-dependente. Além disso, plaquetas humanas pré-tratadas com bromelina, perderam sua capacidade de estimular a invasão de células metastásicas (MAURER, 2001). Este mesmo autor cita que a bromelina retira as moléculas CD44, que são marcadores de superfície celular, carregadas pelas células metastásicas durante sua migração através da corrente sanguínea, por meio das quais podem se aderir ao endotélio vascular.

Grabowska e cols. (1997) estudaram o efeito *in vitro* da bromelina e da papaína em colonização pulmonar por células de melanoma de rato (B16F10), na proliferação celular, invasão através de matrigel e expressão de CD44. As proteases inibiram o crescimento do melanoma de maneira dose-dependente, sendo o extrato bruto de bromelina mais ativo. No entanto, o efeito anti-proliferativo não foi relacionado com a atividade proteolítica. No ensaio de invasão da matrigel, as proteases reduziram a capacidade invasiva das células de melanoma em torno de 30%. Com relação ao CD44, o extrato bruto de bromelina foi mais o ativo em abolir a re-expressão do marcador após o tratamento com a protease.

Wald e cols. (2001) estudaram o efeito *in vivo* de uma mistura de enzimas proteolíticas (tripsina, quimiotripsina e papaína) em um modelo de metástase de melanoma (B16) e observaram que a administração dessas enzimas em camundongos inibiu o crescimento do tumor e da recorrência do mesmo. Esses achados estão relacionados com a redução da expressão das moléculas CD44 e CD54 nas células tumorais expostas às enzimas proteolíticas *in vivo*. Diante do mecanismo proposto, pode-se sugerir que outras proteases também podem suprimir o melanoma B16 e restringir sua disseminação por metástase em camundongos.

Ferreira e cols. (2007) estudaram o efeito antineoplásico, *in vitro e in vivo*, de fastuosaina e bromelina em melanoma B16F10-Nex2. Os resultados *in vitro* mostraram que, após 96 horas do tratamento com essas enzimas, separadamente, o crescimento celular foi completamente inibido, e, *in vivo*, as proteases promoveram redução do número de nódulos neoplásicos, além de não terem sido encontrados nódulos de metástase em outros órgãos. Mecanismos relacionados com essas ações são: a eliminação de moléculas de superfície de células tumorais (CD44), além de redução da invasão celular na membrana basal.

Bhui e cols (2012) descreveram os efeitos anti-proliferativo e anti-inflamatório, que corroboram com a ação antineoplásica, *in vitro*, contra células de carcinoma epidermoide A431 e melanoma A375. Sua eficácia, juntamente com a não-toxicidade contra células normais, torna a bromelina promissora como agente anticâncer.

Pillai e cols. (2014) trataram células de mesotelioma peritoneal maligno (neoplasia rara do peritônio causada pela exposição ao amianto) com diferentes concentrações de bromelina, e outro teste tendo bromelina associada com cisplatina ou 5-fluorouracil. A associação aumentou a citotoxicidade da cisplatina consideravelmente, enquanto não houve alteração com o 5-fluoracil. A bromelina induziu a morte celular por apoptose e autofagia, sendo um potencial agente contra mesotelioma peritoneal maligno.

Bhui e cols. (2010) investigaram o efeito da bromelina em células de carcinoma mamário e perceberam que as células expostas tiveram o crescimento retardado e a indução de autofagia, seguidos de morte celular e apoptose. Bromelinas comercial e recombinante foram capazes de afetar a citocinética de células de câncer de mama MCF-7 através da redução da viabilidade celular, demonstrando força semelhante ao do taxol (FOUZ, 2013). Dhandayuthapani e cols. (2012) mostraram o efeito de diferentes concentrações de bromelina em células de câncer de mama GI-101A, tendo sido obtidas respostas dose-dependentes na indução a apoptose.

Amini e cols. (2013) estudaram o efeito antitumoral da bromelina em diferentes linhagens de células neoplásicas do trato gastrointestinal *in vitro*, e esta exerceu efeito citotóxico, inibindo o crescimento e a proliferação celular.

Diante do exposto, a bromelina apresenta atividade antineoplásica comprovada em diversos modelos e em diferentes tipos de neoplasias, sendo um forte candidato à terapia antineoplásica sozinha ou em combinação. Seus efeitos são diversos, estando diretamente ligados à célula tumoral induzindo à morte celular ou indiretamente, agindo em outros mecanismos que culminam com o efeito protetor ao surgimento do câncer, como ação anti-inflamatória, anticoagulante, fibrinolítica, etc.

4.8 Outros efeitos

Segundo Dave e cols. (2012), a bromelina é usada eficazmente como pílula anti-obesidade (France Vita Natura Pvt Ltd.). Em seu trabalho, esses autores elucidaram o mecanismo da bromelina do caule na modulação da adipogênese, e verificaram que a nível celular, ela inibe irreversivelmente a diferenciação do adipócito através da redução da expressão gênica da adipogênese e induz a apoptose e a lipólise em adipócitos maduros. Esses efeitos são dependentes da atividade proteolítica.

A bromelina tem sido tradicionalmente usada na síntese de vacinas. Através da clivagem enzimática da proteína hemaglutinina, libera partes do vírus influenza, e esse produto da clivagem é usado como antígeno para gerar anti-soro, que é essencial para a produção da vacina contra esse patógeno. A hemaglutinina do vírus H1N1 não é clivada eficientemente pela bromelina, no entanto, foi possível obter anti-soro para o H1N1 a partir de um vírus recombinante (WANG et al., 2012).

Segundo Dutta e Bhattacharyya (2013), o extrato das folhas de abacaxi, na medicina popular, é usado como antimicrobiano, vermífico, purgativo, emenagogo, abortivo, antiedematoso e anti-inflamatório. Embora as folhas contenham altos níveis de atividade proteolítica, têm recebido menor atenção quando comparadas com o caule e o fruto. O extrato aquoso das folhas do abacaxi demonstrou atividades não específicas: proteolítica, gelatinolítica, colagenase, fibrinolítica, fosfatases ácida e alcalina, nuclease, peroxidase, antifúngica e antibacteriana, revelando, assim, sua aplicação no tratamento de infecções microbianas assim como na cicatrização de feridas. No estudo de toxicidade aguda e sub-aguda, não foi observada nenhuma toxicidade ou mortalidade.

4.9 Aspectos farmacocinéticos e toxicológicos da bromelina

A bromelina é bem absorvida por via oral, através do trato gastrointestinal, mantendo a sua forma ativa e a sua ação proteolítica no plasma, mesmo quando ligada com α -2-macroglobulina e α -1-antiquimiotripsina, duas anti-proteinases

presentes no sangue (PAVAN et al., 2012). Embora a atividade seja mantida, torna-se reduzida, visto que, Hale e cols. (2005) relataram que somente 1 µg/mL é suficiente para remover moléculas da superfície celular na ausência de plasma, enquanto que concentrações maiores que 500 µg/mL são necessárias quando as células estão no sangue, devido a presença dos inibidores de proteases no plasma.

Hale (2004) mostrou, em seu estudo, que quantidades significativas da atividade enzimática de bromelina podem ser mantidas em toda parte do trato gastrointestinal de camundongos por muitas horas após administração oral, especialmente usando-se formulação contendo antiácido, pois protege a enzima do pH ácido.

Esse complexo enzimático tem mostrado baixa toxicidade em vários estudos com animais; nenhuma reação tóxica imediata foi vista, e a DL₅₀ foi maior que 10 g/Kg por via oral (MAURER, 2001, ORSINI, 2006). Da mesma forma, 500 mg/Kg/dia por via oral em ratos não provocou nenhuma alteração na ingestão de alimentos, no crescimento, na histologia do coração, dos rins, nem do baço ou parâmetros hematológicos (MAURER, 2001).

São reportados casos isolados de reação alérgica e exacerbações de asma resultantes de exposição ocupacional à bromelina, além de desconforto gastrointestinal após uso oral. Pode, ainda, causar alergia respiratória, tanto do tipo imediato, como tardio, sendo todas essas reações mediadas pela imunoglobulina E. A segurança na gravidez e na lactação não foi determinada (ORSINI, 2006; BROMELAIN, 2010). Devido a sua eficácia após administração oral, sua segurança e falta de efeitos indesejáveis, a bromelina tem sido aceita entre os pacientes como um medicamento fitoterápico (MAURER, 2001).

Mais pesquisas são necessárias para estabelecer a eficácia e a dose ideal para cada indicação clínica. Além disso, as preparações de bromelina contêm outras enzimas e substâncias, por isso, são necessárias mais pesquisas a fim de identificar a contribuição desses componentes aos efeitos terapêuticos da bromelina (ORSINI, 2006).

REFERÊNCIAS

- AICHELE, K. et al. Bromelain down-regulates myofibroblast differentiation in an in vitro wound healing assay. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. v. 386, p. 853-863, 2013.
- AIYEGBUSI, A. I. et al. A comparative study of the effects of bromelain and fresh pineapple juice on the early phase of healing in acute crush Achilles tendon injury. **Journal of Medicinal Food**. v. 14, p. 348-352, 2011.
- AIYEGBUSI, A. I. et al. Bromelain in the early phase of healing in acute crush Achilles tendon injury. **Phytotherapy Research**. v. 25, p. 49-52, 2011.
- AMINI, A. et al. Cytotoxic effects of bromelain in human gastrointestinal carcinoma cell lines (MKN45, KATO-III, HT29-5FI2, and HT29-5M21). **OncoTargets and Therapy**. v. 6, p. 403-409, 2013.
- BÁEZ, R. et al. In vivo antitumoral activity of stem pineapple (*Ananas comosus*) bromelain. **Planta Med**. v. 73, p. 1377-1383, 2007.
- BALA, M. et al. Bromelain production: current trends and perspective. **Archives des Sciences**. v. 65, p. 369-399, 2012.
- BENUCCI, I. et al. Bromelain from pineapple stem in alcoholic-acidic buffers for wine application. **Food Chemistry**. v. 124, p. 1349-1353, 2011.
- BHUI, K. et al. Bromelain inhibits nuclear factor kappa-B translocation, driving human epidermoid carcinoma A431 and melanoma A375 cells through G₂/M arrest to apoptosis. **Molecular Carcinogenesis**. v. 51, p. 231-243, 2012.
- BHUI, K. et al. Pineapple bromelain induces autophagy, facilitating apoptotic response in mammary carcinoma cells. **BioFactors**. v. 36, p. 474-482, 2010.
- BORELLI, F. et al. Inhibitory effects of bromelain, a cysteine protease derived from pineapple stem (*Ananas comosus*), on intestinal motility in mice. **Neurogastroenterology & Motility**. v. 23, p. 745-e331, 2011.
- BROMELAIN, Monograph. **Alternative Medicine Review**. v. 15, p. 361-368, 2010.
- CHANDLER, D. S.; MYNOTT, T. L. Bromelain protects piglets from diarrhoea caused by oral challenge with K88 positive enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Gut**. v. 43, p. 196-202, 1998.
- CHAURASIYA, R. S.; HEBBAR, H. U. Extration of bromelain from pineapple core and purification by RME and precipitation methods. **Separation and Purification Technology**. v. 111, p. 90-97, 2013.
- CHOBOTOVA, K. et al. Bromelain's activity and potential as anti-cancer agent: current evidence and perspectives. **Cancer Letters**. V. 290. P. 148-156. 2010.

COELHO, D. F. et al. Bromelain purification through unconventional aqueous two-phase system (PEG/ammonium sulphate). **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v. 36, p. 185-192, 2013.

DAVE, S. et al. Inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis and lipolysis by stem bromelain in 3T3-L1 adipocytes. **Plos One**. v. 7, p. 1-12, 2012.

DHANDAYUTHAPANI, S. et al. Bromelain-induced apoptosis in GI-101A breast cancer cells. **Journal of Medicinal Food**. v. 15, p. 344-349, 2012.

DOMINGUES, L. F. et al. In vitro and in vivo evaluation of the activity of pineapple (*Ananas comosus*) on *Haemonchus contortus* in Santa Inês sheep. **Veterinary Parasitology**. v. 197, p. 263-270, 2013.

DUTTA, S.; BHATTACHARYYA, D. Enzymatic, antimicrobial and toxicity studies of the aqueous extract of *Ananas comosus* (pineapple) crown leaf. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 150, p. 451-457, 2013.

EMBRAPA Mandioca e Fruticultura. Abacaxi: Banco Ativo de Germoplasma. Disponível em: <http://www.cnpmf.embrapa.br/index.php?p=pesquisa-culturas_pesquisadas-abacaxi.php&menu=2>. Acesso em: 13 fev. 2014.

ENGWERDA, C. R. et al. Bromelain activates murine macrophages and natural killer cells in vitro. **Cellular Immunology**. v. 210, p. 5-10, 2001.

ERRASTI, M. E. et al. Anti-inflammatory activity of *Bromelia hieronymi*: Comparison with bromelain. **Planta Med**. v. 79, p. 207-213, 2013.

FERREIRA, C. A. G. et al. Antitumor effects in vitro and in vivo mechanisms of protection against melanoma B16F10-Nex-2 cells by fastuosain, a cysteine proteinase from *Bromelia fastuosa*. **Neoplasia**. v. 9, p. 723-733, 2007.

FILETI, A. M. F. et al. Batch and continuous extraction of bromelain enzyme by reversed micelles. **Brasilian Archives of Biology and Technology**. v. 52, p. 1225-1234, 2009.

FITZHUGH, D. et al. Bromelain treatment decreases neutrophil migration to sites of inflammation. **Clinical Immunology**. v. 128, p. 66-74, 2008.

Food and Drug Administration. Listing of Specific Substances Affirmed as Generally Recognized as Safe. 2013. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=184.1024>>. Acesso em: 13 fev. 2014.

FOUZ, N. et al, Cytokinetic study of MCF-7 cells treated with commercial and recombinant bromelain. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. v. 14, p. 6709-6714, 2013.

GORODKIEWICZ, E.; BRECZKO, J.; SANKIEWICZ, A. Surface plasmon resonance imaging biosensor for cystatin determination based on the application

of bromelain, ficin and chymopapain. **Folia Histochemica et Cytobiologica**. v. 50, p. 130-136, 2012.

GRABOVAC, V.; SCHNÜRCH, A.B. Improvement of the intestinal membrane permeability of low molecular weight heparin by complexation with stem bromelain. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 326, p. 153-159, 2006.

GRABOWSKA, E. et al. Bromelain proteases suppress growth, invasion and lung metastasis of B16F10 mouse melanoma cells. **International Journal of Oncology**. v. 11, p. 243-248, 1997.

HALE, L. P. et al. Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations. **International Immunopharmacology**. v. 5, p. 783-793, 2005.

HALE, L. P. Proteolytic activity and immunogenicity of oral bromelain within the gastrointestinal tract of mice. **International Immunopharmacology**. v. 4, p. 255-264, 2004.

HEBBAR, U. H. et al. Separation and purification of bromelain by reverse mucellar extraction coupled ultrafiltration and comparative studies with other methods. **Food Bioprocess Technol**. v. 5, p. 1010-1018, 2012.

HU, W. et al. Debriding effect of bromelain od firearm wounds in pigs. **The Journal of Trauma: Injury, Infection and Critical Care**. v. 71, p. 966-972, 2011.

IINCHINGOLO, F. et al. Clinical trial with bromelain in third molar exodontia. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**. v. 14, p. 771-774, 2010.

JOSHI, M. B.; MALLINSON, D. J.; DWYER, D. M. The Human Pathogen *Leishmania donovani* Secretes a Histidine Acid Phosphatase Activity that is Resistant to Proteolytic Degradation. **Journal of Eukaryotic Microbiology**. v. 51, p.108-112, 2004.

KETNAWA, S., et al. Partitioning of bromelain from pineapple peel (*Nang Lae* cultiv.) by aqueous two phase system. **Asian Journal of Food and Agro-Industry**. v. 2, p. 457-468, 2009.

KETNAWA, S.; CHAIWUT, P. RAWDKUEN, S. Aqueous two-phase extraction of bromelain from pineapple peels ('Phu Lae' cultiv.) and it's biochemical properties. **Food Science and Biotechnology**. v. 20, p. 1219-1226, 2011.

KETNAWA, S.; CHAIWUT, P.; RAWDKUEN, S. Extraction of bromelain from pineapple peels. **Food Science and Technology International**. v. 17, p. 395-402, 2011.

KIM, H. J.; TAUB, I. A. Specific degradation of myosin in meat by bromelain. **Food Chemistry**. v. 40, p. 337-343, 1991.

KRIEGER, Y. et al. Efficacy of enzymatic debridement of deeply burned hands. **Burns**. v. 38, p. 108-112, 2012.

KUMAR, S.; HEMAVATHI, A. B.; HEBBAR, H. U. Affinity based reverse micellar extraction and purification of bromelain from pineapple (*Ananas comosus* L. Merrill) waste. **Process Biochemistry**. v. 46, p. 1216-1220, 2011.

LEITE, N. S. et al. Determination of optimal condition to obtain the bromelain from pineapple plants produced by micropropagation. **Brasilian Archives of Biology and Technology**. v. 55, p. 647-652, 2012.

LOPES, F. L. G. et al. Produção e cálculo do custo de um fármaco obtido do suco do abacaxi por microfiltração. **Gestão da Produção, Operações e Sistemas**. Ano 5, p. 93-105, 2010.

MAURER, H. R. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 58, p. 1234-1245, 2001.

MELENDO, et al. Limited proteolysis of myofibrillar proteins by bromelain decreases of coarse dry sausage. **Food Chemistry**. v. 57, p. 429-433, 1996.

METZIG, C. et al. Bromelain proteases reduce human platelet aggregation in vitro, adhesion to bovine endothelial cells and thrombus formation in rat vessels in vivo. **In Vivo**. v. 13, p. 7-12, 1999.

MÜLLER, S. et al. Placebo-controlled randomized clinical trial on the immunomodulating activities of low- and high-dose bromelain after oral administration – new evidence on the anti-inflammatory mode of action of bromelain. **Phytotherapy Research**. v. 27, p. 199-204, 2013.

ORSINI, R. A. Bromelain. **Plastic and Reconstructive Surgery**. v. 118, p. 1640-1644, 2006.

PAVAN, R. et al. Properties and therapeutic application of bromelain: a review. **Biotechnology Research International**. v. 2012, p. 1-6, 2012.

PILLAI, K. et al. Anticancer effect of bromelain with and without cisplatin or 5-FU on malignant peritoneal mesothelioma cells. **Anti-cancer Drugs**. v. 25, p. 150-160, 2014.

SALAMPESY, et al. Release of antimicrobial peptides through bromelain hydrolysis of leatherjacket (*Meuschenia* sp.) insoluble proteins. **Food Chemistry**. v. 120, p. 556-560, 2010.

SILVA, F. V. et al. Design of automatic control systems for the precipitation of bromelain from the extract of pineapple wastes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 30, p. 1033-1040, 2010.

SILVESTRE, M. P. C. et al. Effect of pH and temperature on the activity of enzymatic extracts from pineapple peel. **Food and Bioprocess Technology**. v. 5, p. 1824-1831, 2012.

SOARES, P. A. G. et al. Purification of bromelain from pineapple wastes by ethanol precipitation. **Separation and Purification Technology**. v. 98, p. 389-395, 2012.

SONG, A. R.; KIM, H. R.; SONG, W. S. Optimization of enzymatic treatment of polyamide fabrics by bromelain. **Fibers and Polymers**. v. 13, p. 282-288, 2012.

SONKLIN, C.; LAOHAKUNJIT, N.; KERDCHOECHUEN, O. Physicochemical and flavor characteristics of flavoring agent from mungbean protein hydrolyzed by bromelain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 59, p. 8475-8483, 2011.

STEPEK, G. et al. Assessment of the anthelmintic effect of natural plant cysteine proteinases against the gastrointestinal nematode, *Heligmosomoides polygyrus*, in vitro. **Parasitology**. v. 130, p. 203-211, 2005.

TAUSSIG, S.; BATKIN, S. Bromelain, the enzyme complex of pineapple (*Ananas comosus*) and its clinical application: an update. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 22, p. 191-203, 1988.

TOCHI, B. N. et al. Therapeutic application of pineapple protease (Bromelain): a review. **Pakistan Journal of Nutrition**. v. 7, p. 513-520, 2008.

VILANOVA NETA, J. L. et al. Bromelain enzyme from pineapple: in vitro activity study under different micropropagation conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 168, p. 234-246, 2012.

WALD, M. et al. Mixture of trypsin, chymotrypsin and papain reduces formation of metastases and extends survival time of C₅₇Bl₆ mice with syngeneic melanoma B16. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**. v. 47, p. S16-S22, 2001.

WANG, W. et al. Generation of recombinant pandemic H1N1 influenza virus with the HA cleavable by bromelain and identification of the residues influencing HA bromelain cleavage. **Vaccine**. v. 30, p. 872-878, 2012.

WEN, S. et al. Bromelain improves decrease in defecation in postoperative rats: modulation of colonic gene expression of inducible nitric oxide synthase. **Life Sciences**. v. 78, p. 995-1002, 2006.

WU, S. Y. et al. Bromelain ameliorates the wound microenvironment and improves the healing of firearm wounds. **Journal of Surgical Research**. v. 176, p. 503-509, 2012.

ZAINAL, S. et al. Optimization of beef tenderization treated with bromelain using response surface methodology (RSM). **Agricultural Sciences**. v. 4, p. 65-72, 2013.

CAPÍTULO 2

**CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA E EFEITO INIBITÓRIO *IN VITRO* DA
BROMELINA DE *Ananas comosus* var *comosus* BGA 771 EM
CULTURA DE MELANOMA B16F10**

RESUMO

A bromelina é um complexo enzimático de proteases que tem inúmeras aplicações terapêuticas, destacando-se, dentre elas, o seu potencial antineoplásico, o qual vem sendo explorado e comprovado em diferentes modelos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. O presente trabalho investigou as atividades proteolítica e específica da bromelina extraída de diferentes partes do abacaxizeiro *Ananas comosus var comosus* BGA 771 (caule, coroa, casca, polpa e folha), através da digestão da caseína, estudou suas características cinéticas através da medida de temperatura e pH ótimos, e, por fim, observou o seu efeito *in vitro* sobre células tumorais de melanoma murino B16F10. O caule apresentou maior atividade proteolítica (81,10 µg/mL/min), enquanto a polpa e a casca apresentaram maiores atividades específicas, 1983,44 e 1822,33 UA/mg de bromelina, respectivamente. A temperatura ótima da enzima do caule e da casca foi de 50 a 70°C, 60 e 70°C para a da coroa, 50 a 80°C para a da polpa e 70°C para a da folha, sendo que a bromelina do caule e da folha manteve cerca de 80% de sua atividade proteolítica mesmo a 90°C. O pH ótimo da coroa, da polpa e da folha foi 6 e 7, enquanto o da casca e o do caule, 6 e 8, respectivamente. A bromelina de todas as partes foi eficaz em inibir em mais de 50% a proliferação do melanoma murino B16F10 após 48 horas, sendo a da coroa a mais significativa, com 72,86% de inibição. A atividade anti-proliferativa da bromelina foi tempo-dependente.

Palavras chave: protease; abacaxi; atividade antineoplásica; efeito antiproliferativo.

ABSTRACT

Bromelain is a complex of proteases that has numerous therapeutic applications, highlighting, among them, their anticancer potential, which has been explored and proven in different models, both *in vitro* and *in vivo*. The present work studied the proteolytic and specific activities of bromelain extracted from different parts of the pineapple *Ananas comosus var comosus* BGA 771 (stem, crown, peel, leaf and pulp) by casein digestion, studied their kinetic characteristics by measuring optimum temperature and optimum pH, and finally, observed its effect *in vitro* on tumor B16F10 murine melanoma cells. The stem showed higher proteolytic activity (81.10 mg/mL/min), while the pulp and peel showed higher specific activities, 1983.44 and 1822.33 UA/mg of bromelain, respectively. The optimum temperature of the stem bromelain and peel was 50 to 70 °C, 60 to 70 °C for the crown, 50 to 80 °C for pulp and 70 °C for the leaves, and stem and the leaves bromelain retained about 80% of its proteolytic activity even at 90°C. The optimum pH of the crown, the pulp and the leaves was 6 and 7, while the peel and the stem was 6 and 8, respectively. After 48 hours all bromelain was effective in inhibiting more than 50% the murine melanoma B16F10 proliferation, the crown was the most significant at 72.86% inhibition. The antiproliferative activity of bromelain was time-dependent.

Keywords: protease; pineapple; antineoplastic activity; antiproliferative effect.

INTRODUÇÃO

A bromelina é um complexo enzimático de proteases, obtida a partir do abacaxi. Segundo uma definição de Orsini (2006), é o extrato aquoso bruto obtido do caule e do fruto do abacaxi. No entanto, sabe-se que os demais tecidos vegetais do abacaxizeiro possuem, também, quantidades consideráveis dessa protease (KETNAWA; CHAIWUT; RAWDKUEN, 2012).

Sua atividade contra o câncer tem sido relatada em diversos trabalhos, com diferentes modelos experimentais tanto *in vitro* quanto *in vivo*, tendo sua atividade atribuída a ações diretas sobre as células tumorais, bem como ações sistêmicas que previnem a proliferação e metástese das células neoplásicas (TAUSSING; BATKIN, 1988; CHOBOTOVA et al., 2010; MAURER, 2001). Sua ação antineoplásica a torna uma candidata promissora no desenvolvimento de terapia oral para pacientes oncológicos, embora sejam necessárias mais pesquisas para elucidar seu mecanismo de ação antitumoral. Tem sido amplamente utilizada nas indústrias de alimentos, de cosméticos, médica, farmacêutica, bem como em outras áreas. (PAVAN et al., 2012).

Diante da necessidade de se explorarem as fontes dessa enzima, o presente estudo objetivou extraí-la a partir de diferentes partes do abacaxizeiro *Ananas comosus var comosus* BGA 771, quantificar suas atividades proteolítica e específica, estudar as condições de temperatura e de pH ótimos e, por fim, verificar o seu efeito *in vitro* sobre a proliferação de células de melanoma murino B16F10.

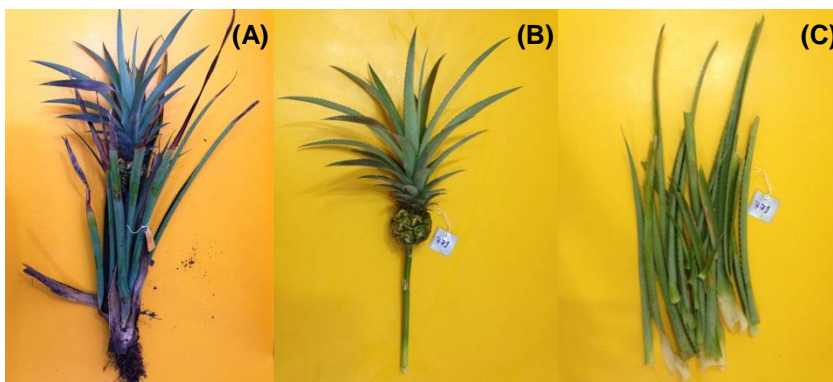
2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção da matéria-prima

O abacaxizeiro *Ananas comosus var comosus* utilizado no presente estudo foi obtido do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical de Cruz das Almas-BA, possuindo código local BGA 771 (Figura 1). As partes utilizadas foram: caule, coroa, casca, polpa e folhas, as

quais foram separadas manualmente, lavadas e cortadas em pequenos pedaços, para serem utilizadas no processo de extração da bromelina.

Figura 1. Partes de *Ananas comosus* var *comosus* BGA 771. (A) Abacaxizeiro; (B) Fruto, coroa, caule; (C) Folhas.



2.2 Obtenção da bromelina

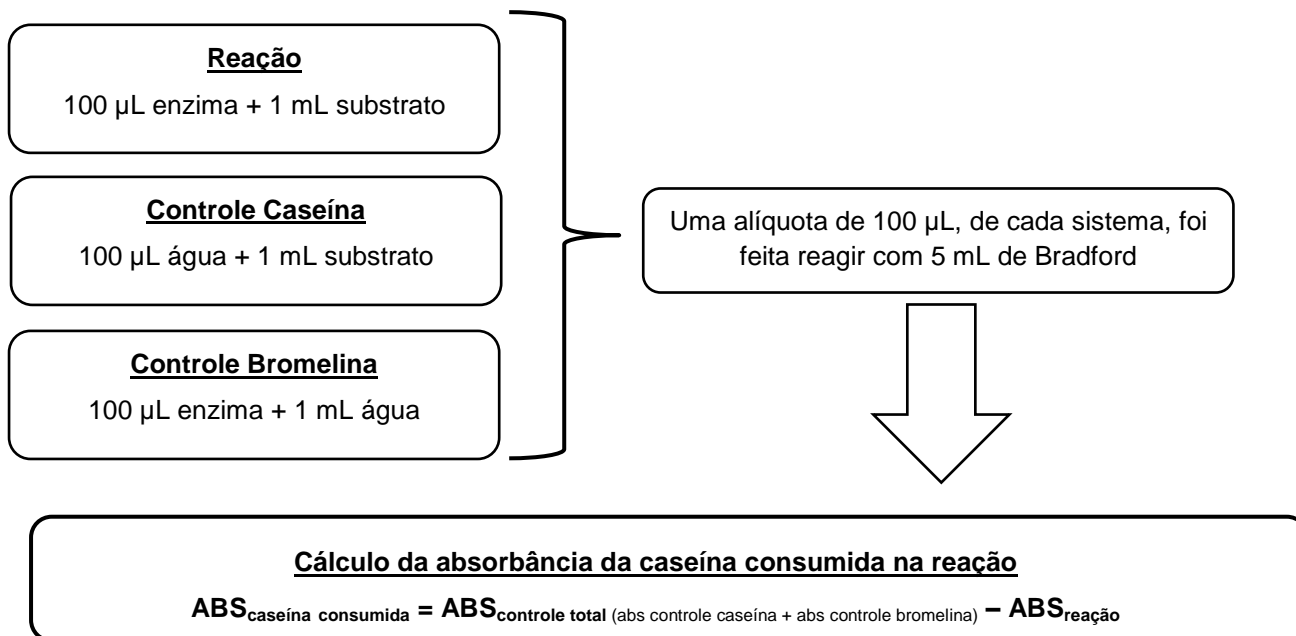
A bromelina de cada parte do abacaxizeiro foi obtida por meio de trituração com tampão fosfato de sódio (0,2 M pH 6,0) na proporção de 1:1 (p/v) em processador doméstico, seguindo-se a filtração com algodão e a centrifugação a 4°C com 10000 rpm por 10 minutos, para a remoção das partículas sólidas. Os extratos foram armazenados em frascos de 4 mL sob congelamento.

2.3 Determinação da atividade proteolítica

Foi utilizado o método da digestão da caseína (KUNITZ, 1947), sendo feitos reagir 100 μ L de bromelina com 1 mL de caseína 0,5%, preparada em tampão fosfato de sódio (0,2 M, pH 6,0), por 20 minutos a 35 °C. Ao final da reação, uma alíquota de 100 μ L da mistura foi retirada e adicionada a 5 mL do reagente de Bradford (1976), seguida de leitura em espectrofotômetro a 595 nm. A Figura 2 ilustra o processo realizado para se calcular a absorbância da quantidade de caseína consumida pela bromelina. Tendo em mãos esse valor, foi

possível calcular a quantidade de caseína consumida em $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{min}$, utilizando-se para isso, a equação da reta gerada a partir da curva padrão de proteína.

Figura 2. Esquema utilizado para os cálculos da absorbância de caseína consumida na reação enzimática.



A absorbância do controle da bromelina representa a quantidade de proteínas do extrato enzimático que estava presente na reação, o que permitiu o cálculo do controle total. Além disso, permitiu, ainda, calcular, em mg, a quantidade de proteínas da bromelina presente na reação, a partir da qual foi possível calcular a sua atividade específica.

Ao mesmo tempo, a absorbância do controle da caseína informou a quantidade desse substrato presente antes de se processar a reação. Somando-se as absorbâncias dos controles da bromelina e da caseína, foi possível obter-se a absorbância total da mistura inicial, enzima:substrato, sem a ocorrência da reação enzimática. Para se obter o valor da absorbância da caseína consumida, subtraiu-se, do controle total, a absorbância após os 20 minutos de reação proteolítica.

Definiu-se uma unidade de atividade proteolítica (UA) como a quantidade de bromelina necessária para a digestão de 1 μg de caseína por minuto nas condições do ensaio. A atividade específica (AE) foi obtida dividindo-se a UA pela quantidade, em mg, de bromelina contida na reação.

2.3.1 Preparo do Reagente de Bradford (1976)

A solução concentrada do reagente de Bradford foi preparada a partir da dissolução de 0,1 g de *Coomassie Brilliant Blue G-250* (Merck) em 50 mL de etanol 95%. A esta solução foram adicionados 100 mL de ácido fosfórico 85%, e, após homogeneização, foi estocada em frasco de vidro âmbar.

Para a quantificação de proteínas, essa solução foi diluída com água numa proporção de 7,5 mL do reagente concentrado para 50 mL de solução final. Esta diluição foi preparada no momento da leitura no espectrofotômetro, visto que sua estabilidade é de aproximadamente 1 hora. Todas as análises utilizaram o Bradford diluído.

2.3.2 Curva padrão de proteína

A curva padrão de proteína foi realizada utilizando-se uma solução padrão de albumina de soro bovino (BSA) (1000 µg/mL). Foram preparadas diluições de 100 a 1000 µg/mL da solução de BSA, sendo que alíquotas de 100 µL foram adicionadas em 5 mL do reagente de Bradford. As misturas foram homogeneizadas em vórtex, e suas absorvâncias, lidas em espectrofotômetro a 595 nm. A partir dos dados obtidos, foi construída uma curva padrão de proteína, tendo-se como variáveis: absorvância *versus* concentração de proteína em µg/mL. Uma equação da reta foi gerada e utilizada nos cálculos de quantificação de proteína nos estudos subsequentes.

2.4 Caracterização cinética

2.4.1 Determinação da temperatura ótima

A atividade proteolítica da bromelina foi estudada em diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 °C) a fim de se investigar a influência desta variável, e de se conhecer qual a condição em que há máxima atividade enzimática. A caseína 0,5% foi preparada em tampão fosfato de sódio 0,2 M,

tendo sido fixado o pH 6,0, e o sistema enzima:substrato foi levado para reagir nas diferentes temperaturas, por 20 minutos, sendo a atividade enzimática, em UA, quantificada em cada ponto. Os dados obtidos foram transformados em atividade proteolítica relativa para a plotagem dos gráficos.

2.4.2 Determinação do pH ótimo

A caseína 0,5% foi preparada em diferentes tampões com diferentes pHs (5, 6, 7, 8 e 9) a fim de se estudar a influência desta variável e conhecer qual a condição em que há máxima atividade proteolítica da bromelina. Foram utilizados os tampões: citrato-fosfato 0,2 M para os pHs 5, 6 e 7, e o tris-HCl para os pHs 8 e 9. A reação foi conduzida por 20 minutos a 60 °C, e a UA foi quantificada em cada ponto. Os dados obtidos foram transformados em atividade proteolítica relativa para a plotagem dos gráficos.

2.5 Preparo das soluções tampão

As soluções tampão utilizadas nos experimentos foram: fosfato de sódio (0,2 M pH6), citrato-fosfato (0,2 M pH 5 a 9), tris-HCl (0,2 M pH 8 e 9), preparadas conforme demonstra a Tabela 1.

Tabela 1. Preparo das soluções tampão.

Tampão	pH	Fosfato de Sódio Monobásico 0,4 M (mL)	Fosfato de Sódio Bibásico 0,4 M (mL)	Ácido Cítrico 0,2 M (mL)	Tris 0,4 M (mL)	HCl 0,4 M (mL)	Água Destilada (mL)	Volume Final
Fosfato de Sódio 0,2 M	6	87,7	12,3	-	-	-	-	100 mL
Citrato-Fosfato 0,2 M	5	-	51,4	48,6	-	-	-	
	6	-	64,2	35,8	-	-	-	
	7	-	87,0	13,0	-	-	-	
Tris-HCl 0,2 M	8	-	-	-	50,0	26,8	23,2	
	9	-	-	-	50,0	5,0	45,0	

2.6 Análises estatísticas

Todos os ensaios foram realizados em triplicata sendo apresentadas as médias e os desvios padrões. Os dados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA, 1%), e ao Teste de TUKEY, 0,1%. Utilizou-se o software BIOSTAT 5 (AYRES et al., 2007).

2.7 Atividade da bromelina em células de melanoma B16F10

2.7.1 Avaliação dos efeitos da bromelina sobre o crescimento de culturas de células de melanoma murino B16F10

Células B16F10 foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium) suplementado com soro bovino fetal a 10%, e acondicionadas em estufa 37 °C e atmosfera com 5% de CO₂. Para os ensaios da atividade da bromelina, as células foram distribuídas em placas de 24 poços, ajustando-se a concentração de células para 2 x 10⁵ células/poço e adicionados os extratos ao meio de cultura na proporção de 1:5 (v/v), que ficaram em contato por 24 e por 48 horas. A avaliação dos efeitos da bromelina foi mensurada através do teste colorimétrico (LSHAI-MICHAELI; ELDOR; VLODAVSKY, 1990), no qual, as células já tratadas no período de 24 e 48 h foram fixadas com metanol, por 10 minutos. A seguir, 500 µL de Azul de Metileno a 0,1% foram adicionados aos poços por mais 10 minutos. Utilizou-se tampão Borato (pH 8,7) para se realizarem lavagens até que todo o excedente do corante fosse retirado. Após esse processo, adicionaram-se 500 µL de HCl a 0,1 N por 10 min e a quantificação foi feita por densidade ótica em Leitor de Microplaca no comprimento de onda de 655 nm.

O teste de significância estatística foi realizado no software GraphPad Prism 5.0 utilizando-se o teste não paramétrico ANOVA e o pós-teste Dunnett, quando se compararam todas as condições com o controle. Considerou-se um resultado significativo quando o valor de *p* esteve menor que 0,05. Para os gráficos foram padronizados que * equivale a *p* < 0,05; ** *p* < 0,001 e *** *p* < 0,0001, nas comparações com o controle.

2.7.2 Determinação da quantidade de proteína total utilizada nos meios de cultura

Para se saber a quantidade de proteínas do extrato enzimático que foi adicionada em cada meio de cultura, diluiu-se cada extrato em água, na mesma proporção em que foi utilizada nos testes de inibição (1:5) e fizeram-se reagir 100 µL da solução diluída com 5 mL do reagente de Bradford (1976), seguindo-se a leitura em espectrofotômetro a 595 nm. As absorbâncias foram comparadas com a curva padrão de albumina, por meio da qual foi possível calcular a quantidade de proteína em µg por cada mL de meio utilizado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação da atividade enzimática nos extratos

A bromelina foi obtida de todas as partes do abacaxizeiro *Ananas comosus* var *comosus* BGA 771, sendo elas: caule, coroa, casca, polpa e folhas. Em cada extrato obtido, foram determinadas a atividade proteolítica (UA) (expressa em µg de caseína consumida/mL de solução/minuto de reação) e a atividade específica (expressa em UA/mg de bromelina presente na reação) que se encontram sumarizadas na Tabela 2.

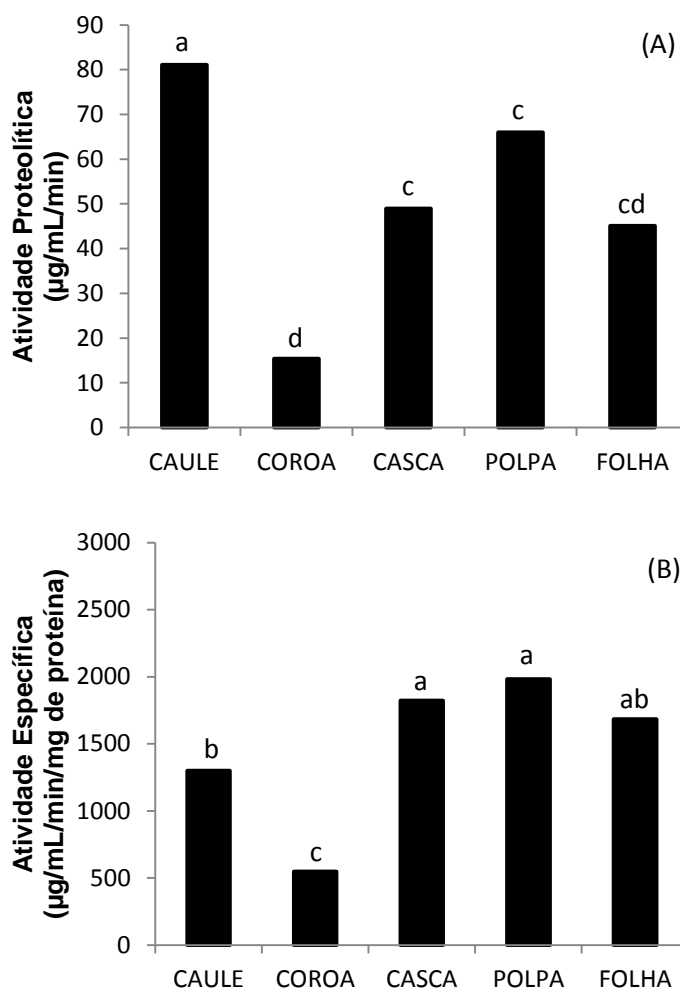
Tabela 2. Atividade proteolítica, atividade específica e quantidade de bromelina presente na reação dos extratos de *Ananas comosus* var *comosus* BGA 771.

Parte	Atividade Proteolítica (µg/mL/min) ¹	Atividade Específica (µg/min/mg de bromelina) ²	Quantidade de Bromelina da Reação (mg/mL) ³
CAULE	81,10 (4,44) a	1300,20 (71,15) b	0,0624 (0,0024) a
COROA	15,36 (0,61) d	548,66 (21,65) c	0,0280 (0,0009) c
CASCA	48,98 (4,68) c	1822,33 (174,21) a	0,0269 (0,0006) c
POLPA	65,96 (5,76) c	1983,44 (173,21) a	0,0333 (0,0002) b
FOLHA	45,07 (6,57) cd	1683,96 (245,68) ab	0,0268 (0,0003) c

¹(F = 77,2447, p < 0,0001); ²(F = 38,948, p < 0,0001); ³(F = 475,69, p < 0,0001).

Médias apresentadas com seus respectivos desvios entre parênteses. Valores com letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (p<0,01), pelo teste de Tukey.

Figura 3. (A) atividade proteolítica e (B) atividade específica da bromelina do caule, da coroa, da casca, da polpa e das folhas de *Ananas comosus* var *comosus* BGA 771.



Os gráficos gerados a partir dos dados contidos na Tabela 2 estão apresentados na Figura 3. As análises dos dados obtidos permitiram verificar que o caule de BGA 771 tem atividade proteolítica significativamente maior que os demais compartimentos do vegetal, seguido da polpa e da casca, da folha e, por último, da coroa, sendo as atividades da polpa e da casca, estatisticamente, iguais.

A atividade enzimática da bromelina pode ser apresentada em atividade proteolítica ou, mesmo, em atividade específica, sendo, nesta, levada em consideração a quantidade de proteínas presente no extrato. Sendo assim, a polpa e a casca foram as partes que apresentaram maiores atividades específicas, sendo suas atividades, estatisticamente, iguais, seguidas da bromelina do caule.

Visto que a enzima presente na casca teve a mesma atividade que a da polpa, pode-se sugerir o seu aproveitamento para a extração da bromelina, a partir dos resíduos da indústria de alimentos, pois, enquanto a polpa é destinada ao consumo, a casca é descartada, contribuindo para o acúmulo dos rejeitos industriais.

Os achados no presente trabalho estão de acordo com Ketnawa, Chaiwut e Rawdkuen (2011). Segundo eles, os resíduos do abacaxi, a saber, coroa, casca e folha, contêm menores quantidades de bromelina em relação ao fruto e ao caule. Foi possível constatar esse fato através da quantidade de bromelina presente na reação, sendo que os resíduos apresentaram quantidades significativamente menores quando comparados com o caule e a polpa. No entanto, sabe-se que essas concentrações de bromelina, em cada compartimento do vegetal, podem variar entre as diferentes espécies, cultivares e variedades de abacaxi existentes.

Há um contrassenso, visto que a bromelina comercializada é obtida a partir do fruto e do caule, enquanto os resíduos contêm quantidades expressivas do complexo enzimático, fato constatado neste trabalho pelas elevadas atividades proteolíticas para os extratos da casca e da folha. Portanto, espera-se que se aumente o interesse pela bromelina desses resíduos, visando tanto ao desenvolvimento sustentável, quanto à redução dos custos de produção.

3.2 Caracterização cinética

3.2.1 Temperatura ótima

Sabe-se que a temperatura é um fator que afeta diretamente a cinética enzimática, interferindo na velocidade de reação. A faixa de temperatura estudada foi de 30 a 90 °C a fim de se verificarem as variações das atividades proteolíticas da bromelina de cada parte do abacaxizeiro BGA 771 sob diferentes condições. Os resultados de atividade proteolítica obtidos, em $\mu\text{g/mL/min}$, estão apresentados na Tabela 3, e, a partir destes, foi plotado o gráfico, em atividade relativa, para melhor visualização do comportamento cinético da bromelina frente à variação da temperatura de reação (Figura 4).

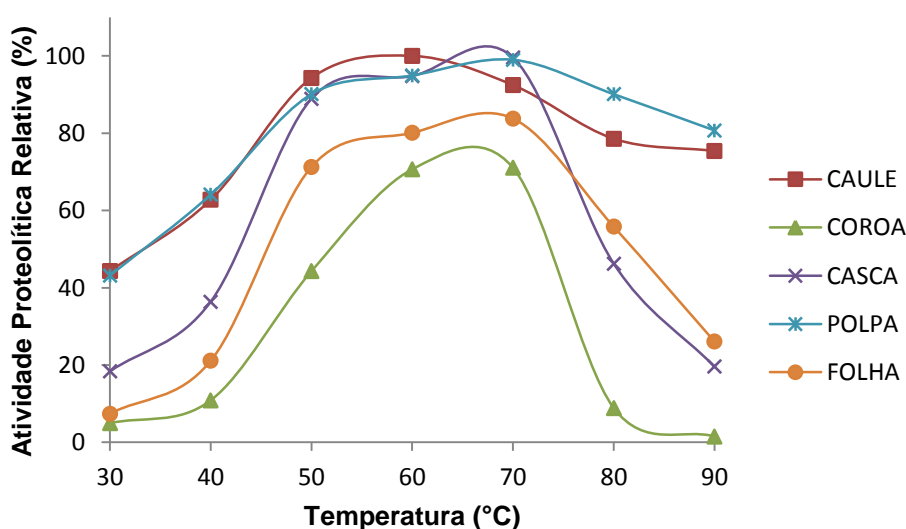
Tabela 3. Atividade proteolítica da bromelina em cada parte de *Ananas comosus* var *comosus* BGA 771 frente às variações de temperatura.

Temp (°C)	Atividade Proteolítica (µg/mL/min)				
	Caule ¹	Coroa ²	Casca ³	Polpa ⁴	Folha ⁵
30	47,13 (2,95) c	5,26 (0,23) d	19,53 (5,27) c	45,94 (11,10) c	9,51 (0,28) e
40	66,78 (9,59) b	11,56 (2,21) c	38,71 (3,61) b	68,21 (8,08) b	22,44 (1,18) d
50	100,33 (1,35) a	47,12 (3,68) b	94,60 (2,37) a	95,87 (4,88) a	75,84 (2,82) b
60	106,42 (1,49) a	75,18 (2,86) a	100,87 (6,49) a	101,02 (1,62) a	85,22 (7,07) ab
70	98,39 (0,96) a	75,61 (0,44) a	105,94 (8,00) a	105,34 (5,04) a	89,15 (4,20) a
80	83,59 (4,30) b	11,76 (0,58) c	49,20 (9,81) b	95,86 (0,56) a	59,38 (5,00) c
90	80,34 (7,31) b	2,63 (0,57) d	20,85 (3,30) c	85,89 (2,72) ab	27,74 (5,26) d

¹(F = 52,1317, p < 0,0001); ²(F = 807,7706, p < 0,0001); ³(F = 117,2689, p < 0,0001); ⁴(F = 38,2992, p < 0,0001); ⁵(F = 171,7907, p < 0,0001).

Médias apresentadas com seus respectivos desvios entre parênteses. Valores com letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (p<0,01), pelo teste de Tukey.

Figura 4. Variação da atividade proteolítica da bromelina de diferentes partes de *Ananas comosus* var *comosus* BGA 771 frente às variações da temperatura de reação de 30 a 90 °C.



Diante da análise dos dados, foi possível detectarem-se faixas de temperaturas ótimas para a atividade proteolítica da bromelina de cada parte, sendo de 50 a 70 °C para a do caule e da casca, 60 e 70 °C para a coroa, 50 a 80 °C para a da polpa e 70 °C para a da folha. Foi possível, ainda, constatar que a enzima do caule e da polpa manteve cerca de 80% de sua atividade proteolítica a 90 °C, sendo, este achado, de suma relevância para a aplicação industrial da bromelina.

Xue e cols. (2010) encontraram uma faixa de temperatura ótima para a bromelina do caule comprada da Sigma-Aldrich (USA), exatamente igual aos achados deste trabalho, ou seja, de 50 a 70 °C. No entanto, quando exposta a 90

°C, perdeu totalmente a sua atividade proteolítica. Já a bromelina estudada por Silvestre e cols. (2012), extraída da casca do abacaxi, apresentou ponto ótimo de atividade em 70 °C.

Ketnawa, Chaiwut e Rawdkuen (2012) encontraram resultados semelhantes, em parte, no estudo de temperatura ótima, tendo sido relatada atividade máxima a 50 °C para a bromelina de todas as partes da cultivar Nang Lae, a saber, medula do fruto, caule, coroa e casca, com perda considerável de atividade acima da temperatura ótima, exceto para a do caule, que perdeu pouca atividade, mesmo a 90 °C. O mesmo comportamento foi relatado para a variedade Phu Lae, embora somente a coroa tivesse atividade máxima em 50 °C, tendo a bromelina das outras partes (medula do fruto, caule, coroa e casca), temperatura ótima de 60 °C.

3.2.2 pH ótimo

O pH ótimo é outro parâmetro importante para a caracterização cinética de enzimas. Diante desse fato, estudou-se o pH ótimo da bromelina extraída de cada parte do abacaxizeiro, variando-se de 5 a 9, a fim de se verificar em qual condição ela teve maior ação proteolítica. A Tabela 4 sumariza os resultados obtidos experimentalmente, e a Figura 5 ilustra o comportamento dos dados em um gráfico de atividade relativa *versus* pH. Para esse teste, foi fixada a temperatura de 60 °C.

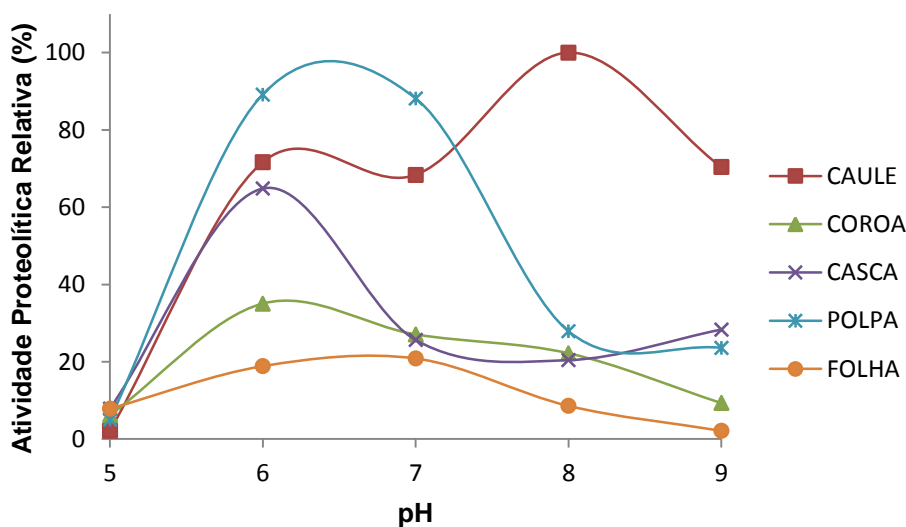
Tabela 4. Atividade proteolítica da bromelina em cada parte de *Ananas comosus* var *comosus* BGA 771 frente às variações de pH.

pH	Atividade Proteolítica (µg/mL/min)				
	Caule ¹	Coroa ²	Casca ³	Polpa ⁴	Folha ⁵
5	1,45 (0,14) c	4,23 (0,70) c	5,39 (0,93) d	3,45 (0,59) c	5,38 (0,80) b
6	49,03 (2,27) b	23,99 (5,02) a	44,36 (0,08) a	61,01 (3,82) a	12,91 (0,72) a
7	46,78 (5,27) b	18,53 (0,94) a	17,55 (0,78) bc	60,32 (4,04) a	14,27 (3,93) a
8	68,43 (0,44) a	15,19 (0,05) ab	13,98 (0,96) c	19,10 (0,59) b	5,87 (0,13) b
9	48,16 (1,86) b	6,37 (1,24) c	19,39 (2,17) b	16,15 (4,49) b	1,45 (0,20) b

¹(F = 251,1001, p < 0,0001); ²(F = 36,5860, p < 0,0001); ³(F = 448,5616, p < 0,0001); ⁴(F = 208,5224, p < 0,0001); ⁵(F = 26,5253, p = 0,0001).

Médias apresentadas com seus respectivos desvios entre parênteses. Valores com letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (p<0,01), pelo teste de Tukey.

Figura 5. Variação da atividade proteolítica da bromelina de diferentes partes de *Ananas comosus* var *comosus* BGA 771 frente às variações do pH de reação de 5 a 9.



A análise dos dados contidos na Tabela 4 e na Figura 5 permitiram concluir que a bromelina obtida de cada parte de *Ananas comosus* var *comosus* BGA 771 apresentou uma característica diferente com relação ao pH ótimo. A enzima da coroa, da polpa e da folha, apresentou atividade máxima nos pHs 6 e 7, enquanto que a casca e o caule apresentaram pH ótimo 6 e 8, respectivamente. Esses dados permitem supor que se tratam de isoenzimas, visto que não têm o mesmo perfil cinético, mesmo em se tratando da bromelina da coroa, da polpa e da folha, uma vez que apresentaram perfis diferentes quanto ao estudo de temperatura ótima. Silvestre e cols (2012) encontraram pH ótimo 6 e 7 para a bromelina obtida da casca, enquanto Xue e cols (2010) encontraram pH ótimo de 7 para a bromelina do caule, comprada da Sigma-Aldrich (USA)

As cultivares Phu Lae e Nang Lae, reportadas por Ketnawa, Chaiwut e Rawdkuen (2012) apresentaram bromelina com pHs ótimos diferentes em cada parte da planta estudada. A enzima obtida da medula do fruto, da casca e da coroa de Nang Lae, apresentou atividade máxima no pH 7; já as mesmas partes da cultivar Phu Lae apresentaram pHs ótimos 7, 8 e 6, respectivamente. A bromelina do caule teve atividade máxima no pH 8, para as duas cultivares.

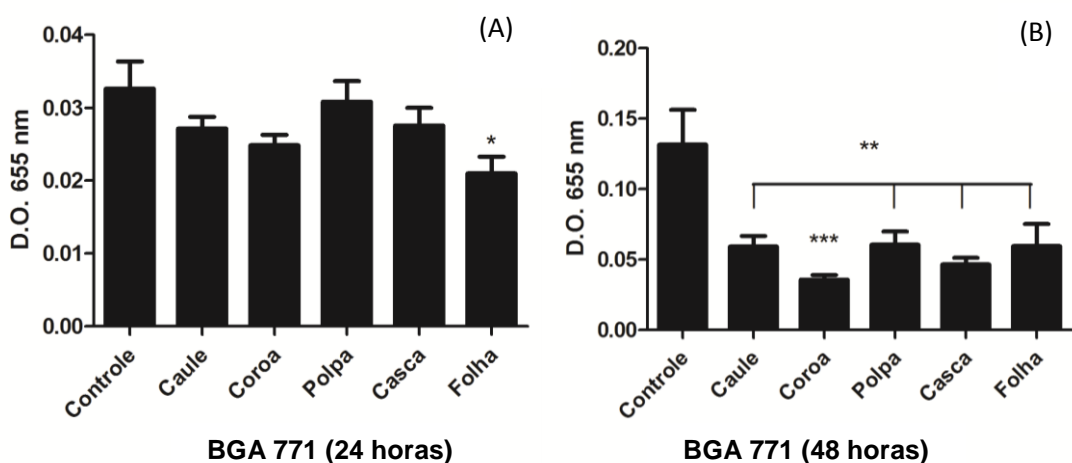
Correlacionando os dados obtidos com os resultados de outros trabalhos, percebeu-se que a bromelina tem maior atividade proteolítica em pHs em torno da neutralidade, apresentando baixas atividades, ou total perda de sua ação catalítica em pHs ácido ou básico.

3.3 Atividade da bromelina em células de melanoma B16F10

A atividade antineoplásica da bromelina é, há muito, conhecida, desde que Taussing e Batkin fizeram, em 1988, uma revisão abordando essa aplicação, dentre outras ações terapêuticas para a enzima. Estudos *in vivo* e *in vitro* correlacionam a bromelina com a atividade citotóxica direta em células tumorais, bem como, efeitos indiretos, que comprometem o crescimento e proliferação do tumor.

Neste trabalho foram estudados, *in vitro*, os efeitos da bromelina sobre o crescimento de culturas de células de melanoma murino, por 24 e por 48 h, estando os resultados obtidos apresentados na Figura 6, e a porcentagem de inibição da proliferação celular apresentada na Tabela 5.

Figura 6. Efeito da bromelina das diferentes partes do abacaxizeiro *Ananas comosus var comosus* BGA 771 sobre o crescimento de culturas de células de melanoma B16F10 após 24 h (A) e 48 h (B).



Significância estatística * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$, comparados com o controle.

Tabela 5. Porcentagem de inibição da proliferação de culturas de células de melanoma B16F10 após 24 h e 48 h sob a exposição da bromelina de *Ananas comosus var comosus* BGA 771.

Parte	Inibição (%)	
	24 h	48 h
CAULE	16,75	54,92**
COROA	23,80	72,86***
POLPA	5,52	53,96**
CASCA	15,53	64,58**
FOLHA	35,65*	54,72**

Significância estatística * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$, comparados com o controle.

A análise dos dados apresentados na Figura 6 e Tabela 5 permitiu observar que a bromelina de todas as partes do abacaxizeiro foi eficaz em inibir a proliferação do melanoma murino após 48 horas de exposição, sendo que apenas a bromelina da folha inibiu significativamente em 24 horas. A enzima da coroa promoveu a inibição mais significativa, 72,86%, quando comparada com o controle, enquanto a bromelina do caule, da polpa, da casca e da folha, inibiu em mais de 50% a proliferação da cultura de células neoplásicas.

A concentração de bromelina presente em cada ensaio foi quantificada, e os valores, apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Concentração de proteína total da bromelina de *Ananas comosus* var *comosus* BGA 771 nos meios de cultura de melanoma B16F10.

Parte	Proteína Total no teste de inibição ($\mu\text{g/mL}$) ¹
CAULE	137,23 (5,38) a
COROA	61,60 (2,08) c
CASCA	59,13 (1,35) c
POLPA	73,16 (0,34) b
FOLHA	58,88 (0,68) c

¹(F = 475,69, p < 0,0001).

Médias apresentadas com seus respectivos desvios entre parênteses. Valores com letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (p < 0,01), pelo teste de Tukey.

Analisando-se os dados obtidos, não foi possível correlacionar a atividade anti-proliferativa com a atividade proteolítica ou com a quantidade de proteína total no extrato, visto que todas as partes testadas inibiram o crescimento da cultura, não tendo sido proporcional a nenhum dos parâmetros estudados. Portanto, acredita-se que esse efeito esteja relacionado com a fração não proteolítica dos extratos estudados no presente trabalho.

Além disso, embora a coroa tenha sido a parte mais ativa, foi a que apresentou menores atividades proteolítica e específica, tendo o menor conteúdo de proteína total, juntamente com a casca e a folha. Esperava-se que o caule e a polpa apresentassem maiores efeitos anti-proliferativos, visto que possuem os maiores conteúdos de bromelina, no entanto, isso não ocorreu. Observou-se ainda que a atividade máxima da bromelina estudada no presente trabalho ocorre acima de 50 °C, e o pH ótimo entre 6 e 8. Um estudo de Bhui e cols. (2012) mostrou que a ação da bromelina sobre células de melanoma A375 é dose e tempo-dependente, tendo sido obtida inibição da proliferação e do crescimento

celular, sendo a IC₅₀ de 400 mg/mL de bromelina por 48 horas de exposição. No entanto, os resultados obtidos no presente trabalho não corroboram com os achados de Bhui e cols., tendo sido obtida potência de inibição muito maior, uma vez que, com apenas 61,60 µg/mL de bromelina, o extrato da coroa apresentou 72,86% de inibição da proliferação celular do melanoma B16F10, não tendo sido encontrada correlação de dose, embora o efeito tenha sido tempo-dependente.

Guimarães-Ferreira e cols. (2007) investigaram o efeito de fastuosaína (protease de *Bromelia fastuosa* que possui 79% de homologia com os aminoácidos da bromelina) contra células de melanoma B16F10-Nex2 *in vivo* e *in vitro*, e perceberam que sua ação antitumoral teve efeitos direto e indireto sobre as células neoplásicas, e, segundo eles, embora as proteases endógenas estejam, muitas vezes, envolvidas com o desenvolvimento do câncer, as proteases externas podem ser eficazes em proteger contra o seu crescimento, assegurando, assim, a importância de se investigarem as ações da bromelina sobre células neoplásicas.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A bromelina extraída das diferentes partes do abacaxizeiro *Ananas comosus* var *comosus* BGA 771 apresentou atividades proteolítica e específica diferentes, tendo o caule a maior atividade proteolítica, enquanto a atividade específica foi maior para a polpa e a casca. A temperatura ótima foi representada, na maioria das partes, por faixas de temperaturas em que a atividade enzimática foi estatisticamente igual. A bromelina do caule e a da polpa mantiveram cerca de 80% de sua atividade proteolítica mesmo a 90 °C, sendo esse resultado de relevância para sua aplicação industrial.

A bromelina de todos os extratos apresentou pontos ótimos de atividade em pHs em torno da neutralidade. Todas as partes do abacaxizeiro inibiram a proliferação do melanoma murino após 48 horas de exposição, tendo a coroa atividade mais expressiva. O efeito anti-proliferativo da bromelina foi tempo-dependente, não havendo correlação direta entre sua ação com a concentração de proteínas no extrato, nem mesmo, com a atividade enzimática.

Visto que todas as partes de BGA 771 contêm a bromelina, pode-se sugerir que os resíduos do processamento industrial de abacaxi podem ser potenciais fontes desse complexo enzimático, sendo úteis para a geração de produtos com alto valor agregado, com aplicações biotecnológicas, principalmente na indústria farmacêutica, na síntese de medicamentos à base dessa protease.

REFERÊNCIAS

AYRES, M. et al. BIOESTAT – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. **Ong Mamiraua**. Belém, PA, 2007.

BHUI, K. et al. Bromelain inhibits nuclear fator kappa-B translocation, driving human epidermoid carcinoma A431 and melanoma A375 cells through G₂/M arrest apoptosis. **Molecular Carcinogenesis**. v. 51, p. 231-243, 2012.

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

CHOBOTOVA, K. et al. Bromelain's activity and potential as anti-cancer agent: current evidence and perspectives. **Cancer Letters**. V. 290. P. 148-156. 2010.

ELIAS, M. J.; ARCURI, I. F.; TAMBOURGI, E. B. Condições de pH e temperatura para máxima atividade da bromelina do abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill). **Acta Scientiarum Technology**. v. 33, n. 2, p. 191-196, 2011.

GUIMARÃES-FERREIRA, C. A. et al. Antitumor effects *in vitro* and mechanisms of protection against melanoma B16F10-Nex2 cells by fastuosain, a cysteine proteinase from *Bromelia fastuosa*. **Neoplasia**. v. 9, n. 9, p. 723-733, 2007.

KETNAWA, S.; CHAIWUT, P.; RAWDKUEN, S. Aqueous two-phase extraction of bromelain from pineapple peels ('Phu Lae' cultiv.) and its biochemical properties. **Food Science Biotechnology**. v. 20, n. 5, p. 1219-1226, 2011.

KETNAWA, S.; CHAIWUT, P.; RAWDKUEN, S. Pineapple wastes: a potential source for bromelain extraction. **Food and Bioproducts Processing**. v. 90, p. 385-391, 2012.

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

LSHAI-MICHAELI, R.; ELDOR, A.; VLODAVSKY, I. Heparanase activity expressed by platelets, neutrophils, and lymphoma cells releases active fibroblast growth factor from extracellular matrix. **Cell Regulation**; 1990, Vol. 1, 833-842.

MAURER, H. R. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 58, p. 1234-1245, 2001.

ORSINI, R. A. Bromelain. **Plastic and Reconstructive Surgery**. v. 118, n. 7, p. 1640-1644, 2006.

PAVAN, R. et al. Properties and therapeutic application of bromelain: a review. **Biotechnology Research International**. v. 2012, p. 1-6, 2012.

SILVESTRE, M. P. C. et al. Effect of temperature on the activity of the enzymatic extracts from pineapple peel. **Food Bioprocess Technology**. v. 5, p. 1824-1831, 2012.

TAUSSIG, S.; BATKIN, S. Bromelain, the enzyme complex of pineapple (*Ananas comosus*) and its clinical application: an update. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 22, p. 191-203, 1988.

XUE, Y. et al. Chemical modification of stem bromelain with anhydride groups to enhance its stability and catalytic activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 63, p. 188-193, 2010.

CAPÍTULO 3

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA BROMELINA DE
DIFERENTES PARTES DE *Ananas comosus* var *comosus* BGA
772 E SUA ATIVIDADE *IN VITRO* EM CULTURA DE MELANOMA
B16F10**

RESUMO

A bromelina é o extrato enzimático obtido a partir de plantas da família Bromeliaceae, sendo a *Ananas comosus* a espécie mais estudada. Sua importância terapêutica é amplamente conhecida, abrangendo os efeitos anti-inflamatório, cicatrizante, anticoagulante, dentre outros, e, principalmente, sua ação antineoplásica. O presente trabalho investigou as atividades proteolítica e específica da bromelina extraída de diferentes partes do abacaxizeiro *Ananas comosus* var *comosus* BGA 772: caule, coroa, casca, polpa e folha. Além disso, foram estudadas a caracterização cinética e seu efeito *in vitro* sobre células tumorais de melanoma murino B16F10. As atividades proteolítica e específica foram significativamente maiores na polpa (35,58 UA e 1446,60 UA/mg de bromelina). A temperatura ótima da bromelina da casca foi de 60 a 90 °C; de 40 a 90 °C para a da polpa; 50 a 70 °C para a da coroa; 60 a 70 °C para a da folha, e 60 °C para a do caule. Já o pH 6 foi o pH ótimo para a bromelina de todas as partes, exceto para a da folha, que apresentou dois pontos ótimos: pHs 6 e 8. A enzima da casca foi a única que promoveu inibição significativa da proliferação de melanoma B16F10, sendo de 66,37% após 48 horas de contato. A atividade antiproliferativa da bromelina foi dose-dependente e não teve correlação com a atividade proteolítica da enzima.

Palavras chave: protease; abacaxi; atividade antineoplásica; efeito antiproliferativo.

ABSTRACT

Bromelain is an enzyme extract obtained from plants of the Bromeliaceae family, and *Ananas comosus* is the most studied specie. It's therapeutic importance is widely known, including anti-inflammatory, healing, anticoagulant effects, among others, and especially it's antineoplastic activity. The present work studied the proteolytic and specific activities of bromelain extracted from different parts of the pineapple *Ananas comosus* var *comosus* BGA 772: stem, crown, peels, leaf and pulp. Furthermore, kinetic characterization, and it's effect on murine melanoma B16F10 were investigated *in vitro*. The proteolytic and specific activities were significantly higher in the pulp (35.58 UA and 1446.60 UA/mg of bromelain). The optimum temperature of the bromelain peel was 60 to 90°C, from 40 to 90°C for pulp, 50 to 70°C for crown; 60 to 70°C for the leaf, and 60°C for the stem. The pH 6 was the optimum pH for bromelain all parts, while the leaf bromelain had two great points: pH 6 and 8. The enzyme peel was the one that caused a significant inhibition on melanoma B16F10 proliferation, being 66.37% after 48 hours of contact. The bromelain antiproliferative activity was dose-dependent and did not correlate with the proteolytic activity.

Keywords: protease; pineapple; antineoplastic activity; antiproliferative effect.

INTRODUÇÃO

Bromelina é uma mistura de tiol-endopeptidases, além de outros componentes, como: fosfatases, glicosidades, peroxidases, celulasas, escarasas, glicoproteínas, carboidratos, e inibidores de proteases, encontrada nos diferentes tecidos das plantas da família Bromeliaceae, da qual o *Ananas comosus* é a fonte mais conhecida (PAVAN, 2012; MAURER, 2001; KETNAWA; CHAIWUT; RAWDKUEN, 2011).

Apresenta uma gama de aplicações, abrangendo as indústrias de tecidos, alimentos e, especialmente, farmacêuticas. Dentre suas ações terapêuticas, destacam-se: antiedematosa, fibrinolítica, redução da agregação plaquetária, anti-inflamatória, imunomoduladora, potencializadora da absorção de antibióticos, desbridante de ferimentos, antineoplásica, etc. Devido a sua eficácia, segurança e ausência de efeitos adversos, após a administração oral, a bromelina tem sido aceita como um medicamento fitoterápico (MAURER, 2001).

A bromelina do caule e da polpa é disponível comercialmente, sendo, no entanto, encontrada nos demais tecidos vegetais do abacaxizeiro. A extração e os estudos de caracterização cinética da bromelina, obtida a partir de diferentes partes de abacaxizeiro, torna-se interessante diante de seu potencial de usos biotecnológicos, a fim de se conhecer, bioquimicamente, esse componente, propondo-se aplicações para o mesmo. Sendo assim, o presente estudo objetivou extrair a bromelina de diferentes partes do abacaxizeiro *Ananas comosus* var *comosus* BGA 772, quantificar as atividades proteolítica e específica, estudar as condições de temperatura e de pH ótimos, e, por fim, verificar o seu efeito *in vitro* sobre a proliferação de células de melanoma murino B16F10.

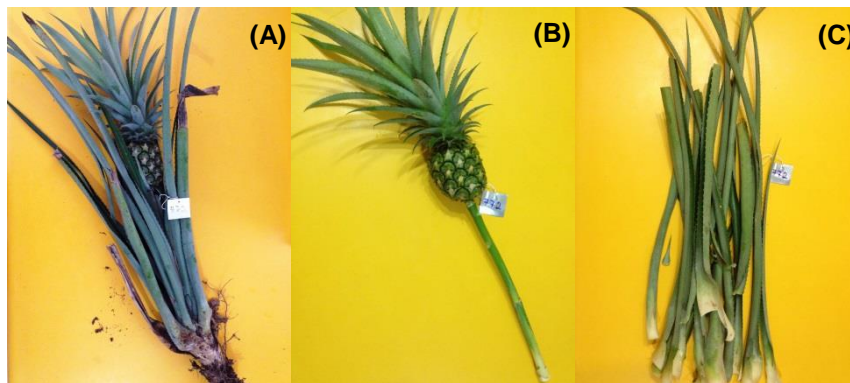
2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção da matéria-prima

O abacaxizeiro utilizado neste estudo foi obtido do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical de Cruz das Almas-Ba, sendo da espécie *Ananas comosus* var *comosus*, possuindo código

local BGA 772 (Figura 1). As partes utilizadas foram: caule, coroa, casca, polpa e folhas, as quais foram separadas manualmente, lavadas e cortadas em pequenos pedaços, para serem utilizadas no processo de extração da bromelina.

Figura 1. Partes de *Ananas comosus* var *comosus* BGA 772. (A) Abacaxizeiro; (B) Fruto, coroa, caule; (C) Folhas.



2.2 Obtenção da bromelina

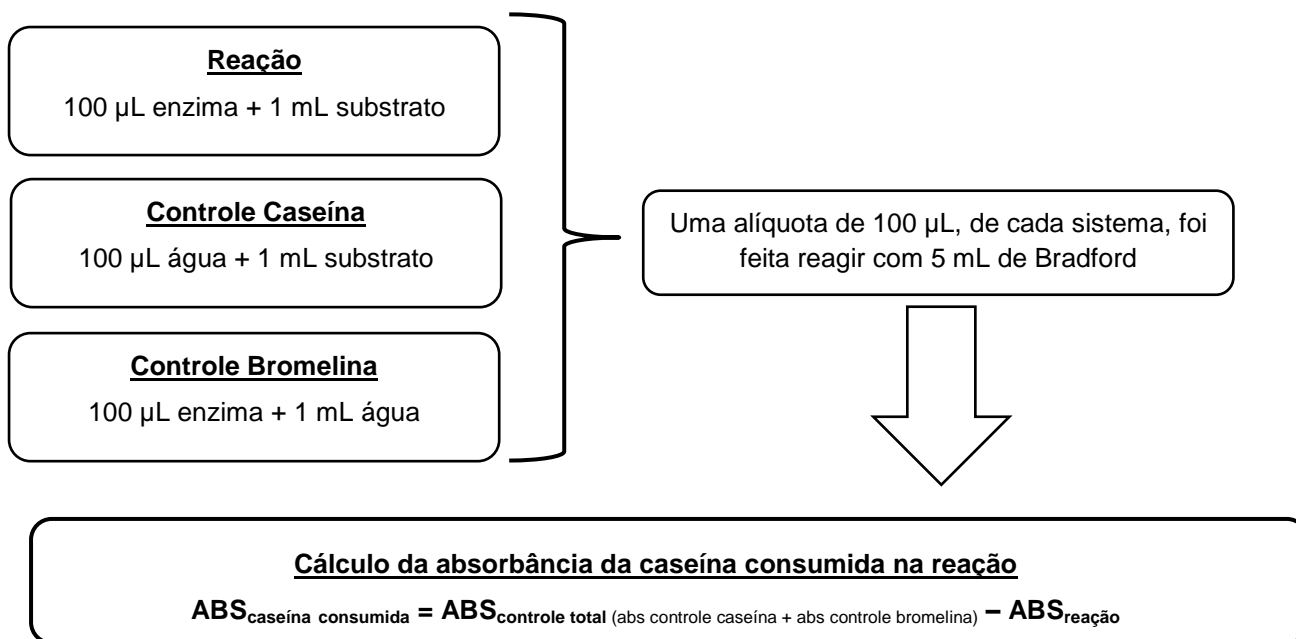
A bromelina de cada parte do abacaxizeiro foi obtida por meio de trituração com tampão fosfato de sódio (0,2 M pH 6,0) na proporção de 1:1 (p/v) em processador doméstico, seguindo-se a filtração com algodão e a centrifugação a 4°C com 10000 rpm por 10 minutos, para a remoção das partículas sólidas. Os extratos foram armazenados em frascos de 4 mL sob congelamento.

2.3 Determinação da atividade proteolítica

Para a determinação da atividade enzimática da bromelina, foi utilizado o método da digestão da caseína (KUNITZ, 1947). A reação foi feita colocando-se para reagir 100 µL de bromelina com 1 mL de caseína 0,5%, preparada em tampão fosfato de sódio (0,2 M, pH 6,0), em tubos de ensaio, por 20 minutos em banho-maria a 35 °C. Após a reação, uma alíquota de 100 µL da mistura foi retirada e adicionada a 5 mL do reagente de Bradford (1976), seguida de leitura em espectrofotômetro a 595 nm. A Figura 2 ilustra o processo realizado para se calcular a absorbância da quantidade de caseína consumida pela bromelina.

Tendo em mãos esse valor, foi possível calcular a quantidade de caseína consumida em $\mu\text{g/mL/min}$, utilizando-se para isso, a equação da reta gerada a partir da curva padrão de proteína.

Figura 2. Esquema utilizado para os cálculos da absorbância de caseína consumida na reação enzimática.



A absorbância do controle da bromelina representa a quantidade de proteínas do extrato enzimático que estava presente na reação, o que permitiu o cálculo do controle total. Além disso, permitiu, ainda, calcular, em mg, a quantidade de proteínas da bromelina presente na reação, a partir da qual foi possível calcular a sua atividade específica.

Ao mesmo tempo, a absorbância do controle da caseína informou a quantidade desse substrato presente antes de se processar a reação. Somando-se as absorbâncias dos controles da bromelina e da caseína, foi possível obter-se a absorbância total da mistura inicial, enzima:substrato, sem a ocorrência da reação enzimática. Para se obter o valor da absorbância da caseína consumida, subtraiu-se, do controle total, a absorbância após os 20 minutos de reação proteolítica.

Definiu-se uma unidade de atividade proteolítica (UA) como a quantidade de bromelina necessária para a digestão de 1 μg de caseína por minuto nas condições do ensaio. A atividade específica (AE) foi obtida dividindo-se a UA pela quantidade, em mg, de bromelina contida na reação.

2.3.1 Preparo do Reagente de Bradford (1976)

A solução concentrada do reagente de Bradford foi preparada a partir da dissolução de 0,1 g de *Coomassie Brilliant Blue G-250* (Merck) em 50 mL de etanol 95%. A esta solução foram adicionados 100 mL de ácido fosfórico 85%, e, após homogeneização, foi estocada em frasco de vidro âmbar.

Para a quantificação de proteínas, essa solução foi diluída com água numa proporção de 7,5 mL do reagente concentrado para 50 mL de solução final. Esta diluição foi preparada no momento da leitura no espectrofotômetro, visto que sua estabilidade é de aproximadamente 1 hora. Todas as análises utilizaram o Bradford diluído.

2.3.2 Curva padrão de proteína

A curva padrão de proteína foi realizada utilizando-se uma solução padrão de albumina de soro bovino (BSA) (1000 µg/mL). Foram preparadas diluições de 100 a 1000 µg/mL da solução de BSA, sendo que alíquotas de 100 µL foram adicionadas em 5 mL do reagente de Bradford. As misturas foram homogeneizadas em vórtex, e suas absorvâncias, lidas em espectrofotômetro a 595 nm. A partir dos dados obtidos, foi construída uma curva padrão de proteína, tendo-se como variáveis: absorvância *versus* concentração de proteína em µg/mL. Uma equação da reta foi gerada e utilizada nos cálculos de quantificação de proteína nos estudos subsequentes.

2.4 Caracterização cinética

2.4.1 Determinação da temperatura ótima

A atividade proteolítica da bromelina foi estudada em diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 °C) a fim de se investigar a influência desta variável, e de se conhecer qual a condição em que há máxima atividade enzimática. A caseína 0,5% foi preparada em tampão fosfato de sódio 0,2 M,

tendo sido fixado o pH 6,0, e o sistema enzima:substrato foi levado para reagir nas diferentes temperaturas, por 20 minutos, sendo a atividade enzimática, em UA, quantificada em cada ponto. Os dados obtidos foram transformados em atividade proteolítica relativa para a plotagem dos gráficos.

2.4.2 Determinação do pH ótimo

A caseína 0,5% foi preparada em diferentes tampões com diferentes pHs (5, 6, 7, 8 e 9) a fim de se estudar a influência desta variável e conhecer qual a condição em que há máxima atividade proteolítica da bromelina. Foram utilizados os tampões: citrato-fosfato 0,2 M para os pHs 5, 6 e 7, e o tris-HCl para os pHs 8 e 9. A reação foi conduzida por 20 minutos a 60 °C, e a UA foi quantificada em cada ponto. Os dados obtidos foram transformados em atividade proteolítica relativa para a plotagem dos gráficos.

2.5 Preparo das soluções tampão

As soluções tampão utilizadas nos experimentos foram: fosfato de sódio (0,2 M pH6), citrato-fosfato (0,2 M pH 5 a 9), tris-HCl (0,2 M pH 8 e 9), preparadas conforme demonstra a Tabela 1.

Tabela 1. Preparo das soluções tampão.

Tampão	pH	Fosfato de Sódio Monobásico 0,4 M (mL)	Fosfato de Sódio Bibásico 0,4 M (mL)	Ácido Cítrico 0,2 M (mL)	Tris 0,4 M (mL)	HCl 0,4 M (mL)	Água Destilada (mL)	Volume Final
Fosfato de Sódio 0,2 M	6	87,7	12,3	-	-	-	-	100 mL
Citrato-Fosfato 0,2 M	5	-	51,4	48,6	-	-	-	
	6	-	64,2	35,8	-	-	-	
	7	-	87,0	13,0	-	-	-	
Tris-HCl 0,2 M	8	-	-	-	50,0	26,8	23,2	
	9	-	-	-	50,0	5,0	45,0	

2.6 Análises estatísticas

Todos os ensaios foram realizados em triplicata sendo apresentadas as médias e os desvios padrões. Os dados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA, 1%), e ao Teste de TUKEY, 0,1%. Utilizou-se o software BIOSTAT 5 (AYRES et al., 2007).

2.7 Atividade da bromelina em células de melanoma B16F10

2.7.1 Avaliação dos efeitos da bromelina sobre o crescimento de culturas de células de melanoma murino B16F10

Células B16F10 foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium) suplementado com soro bovino fetal a 10%, e acondicionadas em estufa 37 °C e atmosfera com 5% de CO₂. Para os ensaios da atividade da bromelina, as células foram distribuídas em placas de 24 poços, ajustando-se a concentração de células para 2 x 10⁵ células/poço e adicionados os extratos ao meio de cultura na proporção de 1:5 (v/v), que ficaram em contato por 24 e por 48 horas. A avaliação dos efeitos da bromelina foi mensurada através do teste colorimétrico (LSHAI-MICHAELI; ELDOR; VLODAVSKY, 1990), no qual, as células já tratadas no período de 24 e 48 h foram fixadas com metanol, por 10 minutos. A seguir, 500 µL de Azul de Metileno a 0,1% foram adicionados aos poços por mais 10 minutos. Utilizou-se tampão Borato (pH 8,7) para se realizarem lavagens até que todo o excedente do corante fosse retirado. Após esse processo, adicionaram-se 500 µL de HCl a 0,1 N por 10 min e a quantificação foi feita por densidade ótica em Leitor de Microplaca no comprimento de onda de 655 nm.

O teste de significância estatística foi realizado no software GraphPad Prism 5.0 utilizando-se o teste não paramétrico ANOVA e o pós-teste Dunnett, quando se compararam todas as condições com o controle. Considerou-se um resultado significativo quando o valor de *p* esteve menor que 0,05. Para os gráficos foram padronizados que * equivale a *p* < 0,05; ** *p* < 0,001 e *** *p* < 0,0001, nas comparações com o controle.

2.7.2 Determinação da quantidade de proteína total utilizada nos meios de cultura

Para se saber a quantidade de proteínas do extrato enzimático que foi adicionada em cada meio de cultura, diluiu-se cada extrato em água, na mesma proporção em que foi utilizada nos testes de inibição (1:5) e fizeram-se reagir 100 µL da solução diluída com 5 mL do reagente de Bradford (1976), seguindo-se a leitura em espectrofotômetro a 595 nm. As absorbâncias foram comparadas com a curva padrão de albumina, por meio da qual foi possível calcular a quantidade de proteína em µg por cada mL de meio utilizado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação da atividade enzimática nos extratos

Foram utilizados os extratos enzimáticos de diferentes partes do abacaxizeiro *Ananas comosus var comosus* BGA 772: caule, coroa, casca, polpa e folhas, nos quais foram determinadas: 1) a atividade proteolítica, ou UA, (expressa em µg de caseína consumida/mL de solução/minuto de reação), e, 2) a atividade específica (expressa em UA/mg de bromelina presente na reação) (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade proteolítica, atividade específica e quantidade de bromelina presente na reação dos extratos de *Ananas comosus var comosus* BGA 772.

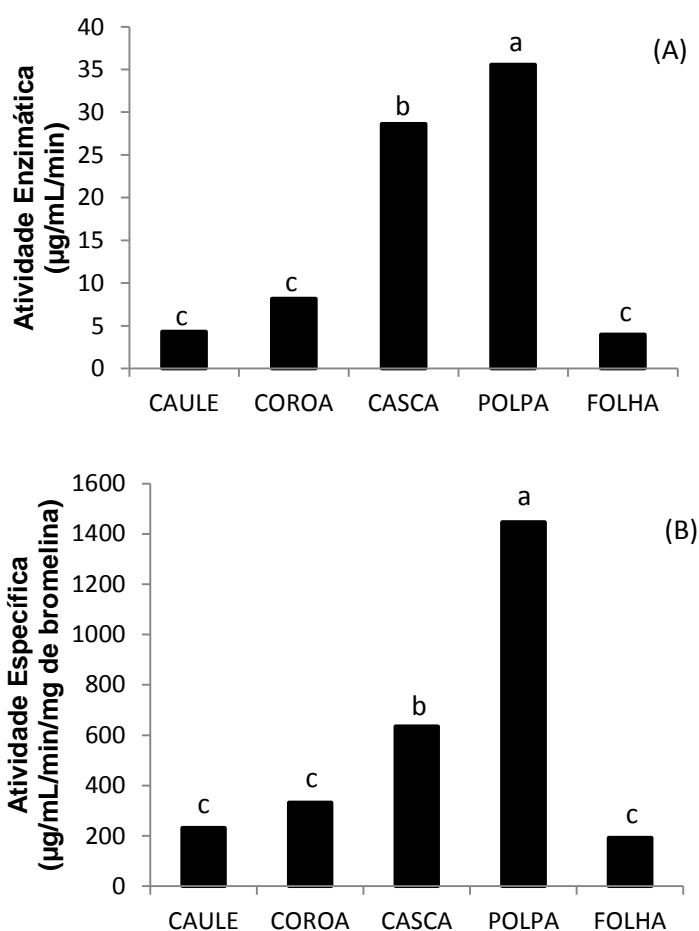
Parte	Atividade Proteolítica (µg/mL/min) ¹	Atividade Específica (µg/min/mg de bromelina) ²	Quantidade de Bromelina da Reação (mg/mL) ³
CAULE	4,29 (1,04) c	232,38 (56,08) c	0,0185 (0,0004) a
COROA	8,18 (1,45) c	332,97 (58,97) c	0,0246 (0,0021) a
CASCA	28,61 (1,79) b	635,44 (39,73) b	0,0450 (0,0026) b
POLPA	35,58 (1,79) a	1446,60 (72,74) a	0,0246 (0,0006) a
FOLHA	3,99 (0,25) c	193,18 (11,96) c	0,0206 (0,0032) a

¹(F = 344,21, p < 0,0001); ²(F = 298,38, p < 0,0001); ³(F = 76,022, p < 0,0001).

Médias apresentadas com seus respectivos desvios entre parênteses. Valores com letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (p<0,01), pelo teste de Tukey.

Os gráficos gerados a partir dos dados contidos na Tabela 2 estão apresentados na Figura 3. Suas análises permitiram verificar que a polpa de BGA 772 tem atividades proteolítica e específica muito maiores que as demais partes do vegetal, seguida da casca, da coroa, caule e folha. No entanto, as análises estatísticas permitem classificar as atividades da coroa, do caule e da folha como estatisticamente iguais, não apresentando diferença significativa.

Figura 3. (A) atividade proteolítica e (B) atividade específica da bromelina do caule, da coroa, da casca, da polpa e das folhas de *Ananas comosus* var *comosus* BGA 772.



Esses dados estão de acordo com os achados de França-Santos e cols. (2009) que compararam, em seu estudo, a atividade proteolítica da bromelina do fruto e da folha de *Ananas comosus* cultivar Pérola, uma das mais comercializadas no Brasil, encontrando maior atividade proteolítica no fruto. No entanto, Abílio e cols. (2009), compararam as atividades proteolíticas da bromelina obtida da casca e da polpa de 4 diferentes cultivares: Smooth Cayenne,

Pérola, Emepa-01, MD-2 e Imperial, obtendo, para todas as cultivares estudadas, maiores atividades nas cascas. Ketnawa, Chaiwut e Rawdkuen (2012) encontraram maiores atividades proteolíticas na coroa e menores nos caules, quando compararam as atividades enzimáticas da bromelina obtida da casca, núcleo do fruto, caule e coroa, de duas cultivares, Nang Lae e Phu Lae, de *Ananas comosus*. Nenhum trabalho foi encontrado comparando todas as partes do abacaxizeiro analisadas no presente estudo (caule, coroa, casca, polpa e folha).

Essas divergências e semelhanças encontradas para as atividades proteolíticas de bromelina, proveniente de diferentes variedades de abacaxi, reafirmam a importância de se estudar cada abacaxizeiro com diferentes espécies, variedades genéticas, ou mesmo, de diferentes origens, visto que não se espera que sejam extrapolados os valores de um estudo para outro, sendo necessário explorarem-se as características de cada variedade ou de cada cultivar separadamente.

3.2 Caracterização cinética

3.2.1 Temperatura ótima

A temperatura é um fator de suma relevância no estudo e caracterização de enzimas por representar um parâmetro que influencia diretamente a sua cinética e estabilidade, influenciando, portanto, em sua atividade. A faixa de temperatura estudada foi de 30 a 90 °C a fim de se verificarem as variações das atividades proteolíticas da bromelina de cada parte do abacaxizeiro BGA 772. Os resultados de atividade proteolítica obtidos, em $\mu\text{g/mL/min}$, estão apresentados na Tabela 3, e, a partir destes, foi plotado o gráfico, em atividade relativa, para melhor visualização do comportamento cinético da bromelina frente à variação da temperatura de reação (Figura 4).

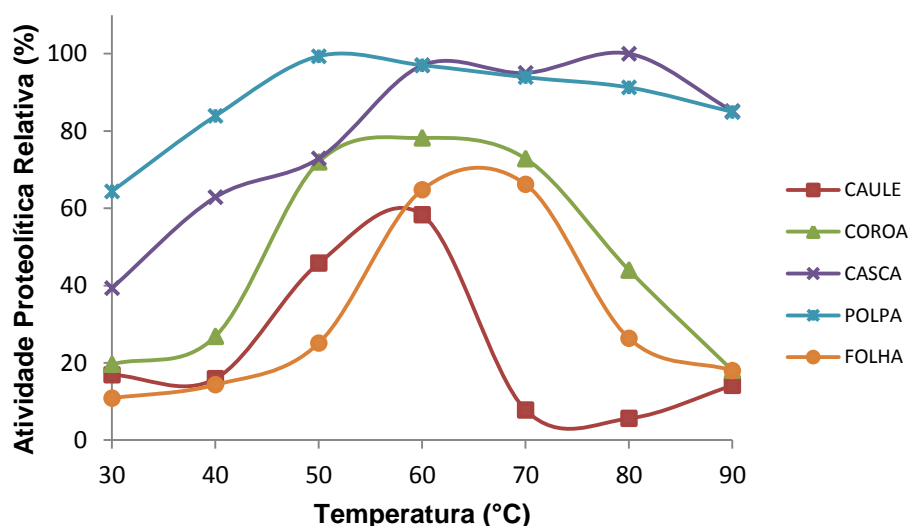
Tabela 3. Atividade proteolítica da bromelina em cada parte de *Ananas comosus* var *comosus* BGA 772 frente às variações de temperatura.

Temp (°C)	Atividade Proteolítica (µg/mL/min)				
	Caule ¹	Coroa ²	Casca ³	Polpa ⁴	Folha ⁵
30	8,42 (0,88) c	12,14 (2,07) c	24,37 (3,58) c	39,86 (3,54) b	1,69 (0,06) d
40	6,47 (0,31) c	13,90 (1,02) c	38,90 (5,31) b	51,92 (0,39) a	11,71 (0,14) c
50	28,33 (2,64) b	44,54 (0,94) a	45,12 (5,13) ab	61,51 (5,61) a	19,36 (0,49) b
60	36,09 (3,51) a	48,39 (1,82) a	60,03 (1,16) a	60,06 (3,08) a	40,09 (1,69) a
70	8,44 (0,19) c	45,09 (1,60) a	58,82 (1,48) a	58,13 (0,74) a	40,98 (1,55) a
80	4,30 (0,70) c	27,23 (3,70) b	61,91 (1,87) a	56,49 (4,80) a	16,30 (1,63) b
90	5,54 (0,28) c	11,15 (2,21) c	52,71 (3,35) a	52,58 (0,80) a	8,98 (0,09) c

¹(F = 164,4812, p < 0,0001); ²(F = 195,1819, p < 0,0001); ³(F = 45,8846, p < 0,0001); ⁴(F = 14,4509, p = 0,0001) ⁵(F = 591,7757, p < 0,0001).

Médias apresentadas com seus respectivos desvios entre parênteses. Valores com letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (p<0,01), pelo teste de Tukey.

Figura 4. Variação da atividade proteolítica da bromelina de diferentes partes de *Ananas comosus* var *comosus* BGA 772 frente às variações da temperatura de reação de 30 a 90 °C.



Diante dos dados obtidos, percebe-se que, em valores absolutos, houve maior atividade da bromelina no extrato da casca quando a reação foi conduzida na temperatura de 80 °C. No entanto, a análise estatística identificou as atividades da bromelina da casca como sendo iguais, estatisticamente, nas temperaturas de 60 a 90 °C. A partir de 40 °C, todas as atividades da bromelina da polpa foram estatisticamente semelhantes. Já a enzima da coroa apresentou maiores atividades entre 50 e 70 °C, havendo desnaturação e conseqüente redução da atividade a partir de 80 °C. A da folha teve maior atividade em 60 e 70 °C, enquanto que a do caule apresentou atividade máxima somente em 60 °C, perdendo significativamente sua ação em temperaturas maiores.

Diante da análise do gráfico apresentado na Figura 4, notou-se que o perfil de atividade das enzimas da polpa e da casca foi muito semelhante, sendo que a 90 °C não houve perda significativa de atividade enzimática.

Da mesma forma, Corzo, Waliszewski e Chanes (2012) encontraram temperatura ótima de 59 °C para a bromelina extraída do fruto de *Ananas comosus*. Em sua revisão, Bala e cols. (2012) sumarizam que a temperatura ótima da bromelina do caule é de 50 a 60 °C, enquanto que a do fruto é muito mais ampla, de 37 a 70 °C. No presente trabalho, a bromelina da polpa também mostrou atividade em maior faixa de temperatura quando comparada com a do caule. Já França-Santos e cols. (2009) encontraram temperatura ótima de 40°C para a bromelina do fruto.

Todos esses resultados corroboram com o fato de que as enzimas obtidas de diferentes origens podem apresentar características cinéticas diferentes, mesmo tratando-se do mesmo complexo enzimático.

3.2.2 pH ótimo

Assim como a temperatura, o pH é um parâmetro essencial no estudo de caracterização enzimática, visto que pequenas alterações promovem diferentes ionizações na biomolécula, causando alterações conformacionais que podem aumentar a afinidade do sítio ativo pelo substrato, ou mesmo, causar desnaturação da macromolécula. Os estudos de caracterização enzimática trazem, principalmente, a análise da influência dessas duas variáveis na atividade catalítica, a fim de se conhecer sob quais condições há maior conversão do substrato em produto, ou seja, onde a atividade é máxima. A faixa de pH estudada no presente trabalho foi de 5 a 9, e verificou-se a influência dessa variação na atividade proteolítica da bromelina de cada parte do abacaxizeiro BGA 772, tendo sido fixada a temperatura em 60 °C.

Os resultados de atividade proteolítica obtidos, em µg/mL/min, estão apresentados na Tabela 4, e, a partir destes, foi plotado o gráfico para melhor visualização do comportamento cinético da bromelina frente à variação do pH de reação, sendo a atividade proteolítica apresentada em porcentagem (Figura 5).

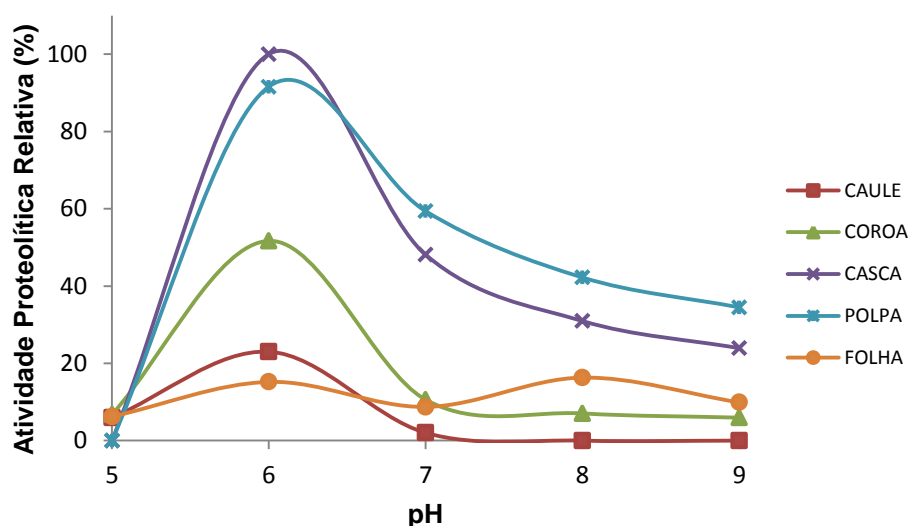
Tabela 4. Atividade proteolítica da bromelina em cada parte de *Ananas comosus* var *comosus* BGA 772 frente às variações de pH.

pH	Atividade Proteolítica ($\mu\text{g/mL/min}$)				
	Caule ¹	Coroa ²	Casca ³	Polpa ⁴	Folha ⁵
5	2,77 (0,14) b	3,15 (0,73) b	0,00	0,00	2,90 (0,74) b
6	10,73 (1,76) a	24,12 (2,04) a	46,66 (1,46) a	42,73 (1,10) a	7,09 (1,77) a
7	0,95 (0,18) b	4,95 (1,05) b	22,45 (1,04) b	27,71 (3,01) b	4,07 (0,03) b
8	0,00	3,29 (0,91) b	14,45 (1,45) c	19,70 (0,59) c	7,61 (0,60) a
9	0,00	2,77 (0,06) b	11,16 (0,47) c	16,09 (3,28) c	4,62 (0,17) b

¹(F = 191,4417, p < 0,0001), ²(F = 193,8305, p < 0,0001), ³(F = 826,6217, p < 0,0001), ⁴(F = 150,0149, p < 0,0001); ⁵(F = 14,9637, p = 0,0006).

Médias apresentadas com seus respectivos desvios entre parênteses. Valores com letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (p<0,01), pelo teste de Tukey.

Figura 5. Variação da atividade proteolítica da bromelina de diferentes partes de *Ananas comosus* var *comosus* BGA 772 frente às variações do pH de reação de 5 a 9.



Analisando-se os dados apresentados na Tabela 4 e na Figura 5, percebeu-se que o pH ótimo de atividade da bromelina, em todas as partes do abacaxizeiro estudadas, foi o 6, enquanto a folha apresentou dois pontos ótimos, sendo eles nos pHs 6 e 8. Sabe-se que o extrato de bromelina contém inúmeras enzimas, estando envolvidas diferentes proteases, as quais podem apresentar pH ótimo de ação diferente, e isso explica os dois pontos ótimos da bromelina da folha do BGA 772, indicando que cada pH é responsável por ser a condição ótima para a ação das proteases diferentes.

Esses resultados estão de acordo com os achados da literatura, visto que, nem sempre, se encontra pH ótimo único, sendo reportadas, muitas vezes, faixas de pHs ótimos, como a revisão de Bala e cols. (2012), que aponta para a bromelina de caule pH ótimo entre 6 e 7, e para a bromelina do fruto, uma ampla

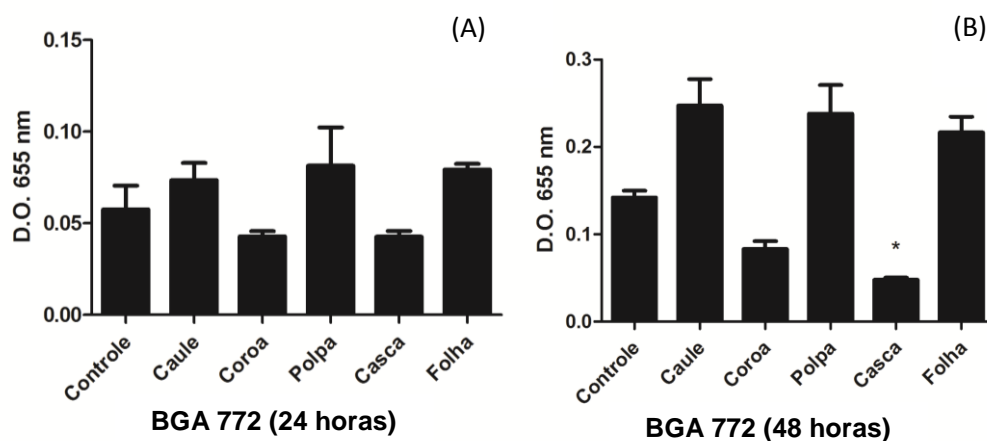
faixa de pH ótimo de 3 a 8. Já Corzo, Waliszewski e Chanes (2012) encontraram pH ótimo de 7,7 para a bromelina extraída do fruto, enquanto França-Santos e cols. (2009) extraíram a bromelina do fruto e encontraram pH ótimo 5.

Esses dados permitem concluir que a bromelina obtida das diferentes partes do mesmo abacaxizeiro pode diferir quanto às suas características cinéticas, diferindo, também, da enzima extraída de diferentes espécies ou variedade genética, como foi constatado na revisão da literatura.

3.3 Atividade da bromelina em células de melanoma B16F10

São reportados na literatura inúmeros trabalhos mostrando a atividade antitumoral da bromelina contra diferentes tipos de câncer, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Diante disso, neste trabalho, foram estudados os efeitos da bromelina sobre o crescimento de culturas de células de melanoma murino, por 24 e por 48 h, estando os resultados obtidos apresentados na Figura 6, e a porcentagem de inibição da proliferação celular, na Tabela 5.

Figura 6. Efeito da bromelina das diferentes partes do abacaxizeiro *Ananas comosus* var *comosus* BGA 772 sobre o crescimento de culturas de células de melanoma B16F10 após 24 h (A) e 48 h (B).



Significância estatística * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$, comparados com o controle.

Tabela 5. Porcentagem de inibição da proliferação de culturas de células de melanoma B16F10 após 24 h e 48 h sob a exposição da bromelina de *Ananas comosus* var *comosus* BGA 772.

Parte	Inibição (%)	
	24 h	48 h
CAULE	-27,94	-73,92
COROA	25,57	41,65
POLPA	-41,68	-67,45
CASCA	25,80	66,37*
FOLHA	-38,03	-52,24

Significância estatística * p < 0,05; ** p < 0,001 e *** p < 0,0001, comparados com o controle.

A Figura 6 ilustra o comportamento das culturas celulares frente à ação da bromelina, sendo evidenciado, no primeiro gráfico, que o extrato enzimático de cada parte estudada não apresentou inibição, estatisticamente significativa, da proliferação celular, quando comparadas com o controle. No entanto, a bromelina da casca, após 48 horas de contato, promoveu a inibição estatisticamente significativa da proliferação de B16F10 em 66,37% do crescimento da cultura. Já a bromelina do caule, da polpa e da folha proporcionou um efeito proliferativo, o que não era esperado, visto que, na literatura, não há relatos desse efeito para culturas de células neoplásicas, embora tenha sido recentemente relatado por Aiyegbusi e cols. (2011) que essa enzima estimulou a proliferação celular de tenócitos, promovendo a cicatrização de lesão no tendão de Aquiles.

Ao contrário, os trabalhos realizados com culturas de células neoplásicas citam exatamente o efeito anti-proliferativo, o qual é amplamente conhecido e descrito para a bromelina desde 1988, quando Taussing e Batkin revisaram os efeitos terapêuticos desse complexo enzimático, especialmente do caule e do fruto, que são as enzimas mais estudadas.

A quantidade de proteína total de cada extrato enzimático que foi utilizada nos testes está apresentada na Tabela 6.

Tabela 6. Concentração de proteína total da bromelina de *Ananas comosus* var *comosus* BGA 772 nos meios de cultura de melanoma B16F10.

Parte	Proteína Total no teste de inibição ($\mu\text{g/mL}$) ¹
CAULE	42,17 (2,70) b
COROA	54,06 (4,70) b
CASCA	99,06 (5,76) a
POLPA	54,11 (1,34) b
FOLHA	45,43 (6,99) b

¹(F = 70,244, p < 0,0001).

Médias apresentadas com seus respectivos desvios entre parênteses. Valores com letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (p < 0,01), pelo teste de Tukey.

Sabe-se que o efeito anti-proliferativo da bromelina sobre as células neoplásicas é dose-dependente, e, portanto, a partir dos dados obtidos neste trabalho, pode-se afirmar que, nas condições estudadas, apenas a bromelina da casca teve um efeito inibitório significativo. No entanto, para atestar que a enzima das outras partes não é capaz de inibir o melanoma B16F10, necessita-se testá-la em concentrações maiores, visto que se utilizou apenas uma concentração, sendo de 1 parte de extrato para 5 partes de meio de cultura, tendo, cada uma, diferente quantidade de proteína total conforme exposto na Tabela 5. Além disso, a bromelina da casca apresentou concentração de proteína total muito maior quando comparada com os demais extratos, o que corrobora com os relatos de que a inibição da proliferação de células neoplásicas é dose-dependente, e reafirmando a necessidade de se testarem novamente as amostras com maiores concentrações de bromelina. Percebeu-se, ainda, que a ação inibitória não teve correlação com a atividade proteolítica, visto que a bromelina da polpa foi a que apresentou maior atividade, promovendo, no entanto, a proliferação do melanoma B16F10.

Os resultados obtidos corroboram com os achados de Grabowska e cols. (1997), em cujo estudo, a bromelina e a papaína inibiram a proliferação celular, *in vitro*, de melanoma B16F10 de maneira dose-dependente, tendo sido o extrato bruto da bromelina o mais ativo. Os autores afirmaram que o efeito anti-proliferativo não teve correlação com a atividade proteolítica, o que reafirma as considerações do presente trabalho. Estudos *in vitro* com outras linhagens de células neoplásicas também relacionam a inibição da proliferação celular com a dose, de maneira diretamente proporcional, como foi o caso de Amini e cols. (2013), que obtiveram efeito citotóxico pela ação da bromelina, de maneira dose-dependente, manifestada através da inibição do crescimento e da proliferação de células neoplásicas gastrointestinais.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As diferentes partes (caule, coroa, casca, polpa e folhas) do abacaxizeiro *Ananas comosus* var *comosus* BGA 772, apresentaram bromelina com atividades proteolíticas e específicas diferentes, sendo maiores na polpa, seguida pela

bromelina da casca e, por fim, das demais partes. Para a maioria das partes, a temperatura ótima da bromelina foi representada por uma faixa, exceto para a do caule, que apresentou um ótimo em 60°C. Já o pH 6 foi o pH ótimo para a atividade proteolítica da bromelina de todas as partes do abacaxizeiro estudadas, enquanto a da folha apresentou pontos ótimos em pHs 6 e 8. A enzima da casca foi a única que promoveu inibição significativa da proliferação de melanoma B16F10, após 48 horas de contato, tendo sido observado um efeito dose-dependente, sem correlação com a atividade proteolítica, visto que a bromelina da polpa foi a que apresentou maior atividade, promovendo, no entanto, a proliferação do melanoma B16F10, ao invés da inibição. Necessita-se, entretanto, concentrar os extratos que não foram capazes de inibir, para se verificar se há efeito anti-proliferativo em doses maiores, bem como estudar diferentes concentrações da bromelina da casca para identificar a melhor concentração de inibição.

REFERÊNCIAS

- ABÍLIO, G. M. F. et al. Extração, atividade da bromelina e análise de alguns parâmetros químicos em cultivares de abacaxi. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 31, p. 1117-1121, 2009.
- AIYEGBUSI, A. I. et al. Bromelain in the early phase of healing in acute crush Achilles tendon injury. **Phytotherapy Research**. v. 25, p. 49-52, 2011.
- AMINI, A. et al. Cytotoxic effects of bromelain in human gastrointestinal carcinoma cell lines (MKN45, KATO-III, HT29-5FI2, and HT29-5M21). **OncoTargets and Therapy**. v. 6, p. 403-409, 2013.
- BALA, M. et al. Bromelain production: current trends and perspective. **Archives des Sciences**. v. 65, p. 369-399, 2012.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248 – 254, 1976.
- CORZO, C. A.; WALISZEWSKI, K. N.; CHANES, J. W. Pineapple fruit bromelain affinity to different protein substrates. **Food Chemistry**. v. 133, p. 631-635, 2012.
- FRANÇA-SANTOS, A. et al. Estudos bioquímicos da enzima bromelina do *Ananas comosus* (abacaxi). **Scientia Plena**. v. 5, 2009.

GRABOWSKA, E. et al. Bromelain proteases suppress growth, invasion and lung metastasis of B16F10 mouse melanoma cells. **International Journal of Oncology**. v. 11, p. 243-248, 1997.

KETNAWA, S.; CHAIWUT, P.; RAWDKUEN, S. Extraction of bromelain from pineapple peels. **Food Science and Technology International**. v. 17, p. 395-402, 2011.

KETNAWA, S.; CHAIWUT, P.; RAWDKUEN, S. Pineapple wastes: a potential source for bromelain extraction. **Food and Bioproducts Processing**. v. 90, p. 385-391, 2012.

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

LSHAI-MICHAELI, R. et al. Heparanase activity expressed by platelets, neutrophils, and lymphoma cells releases active fibroblast growth factor from extracellular matrix. **Cell Regulation**. v. 1, p. 833-842, 1990.

MAURER, H. R. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 58, p. 1234-1245, 2001.

PAVAN, R. et al. Properties and therapeutic application of bromelain: a review. **Biotechnology Research International**. v. 2012, p. 1-6, 2012.

TAUSSIG, S.; BATKIN, S. Bromelain, the enzyme complex of pineapple (*Ananas comosus*) and its clinical application: an update. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 22, p. 191-203, 1988.

CONCLUSÃO GERAL

Com este trabalho foi possível constatar que todas as partes dos abacaxizeiros estudados, *Ananas comosus* var *comosus* BGA 771 e BGA 772, contêm o complexo enzimático de interesse, a bromelina, com diferentes atividades proteolíticas. Diante de uma demanda mundial pelo aproveitamento de resíduos industriais, consideram-se esses resultados de grande valor, visto que se pode isolar esse princípio ativo do descarte industrial e utilizá-lo nas suas mais diversas aplicações.

A bromelina de todas as partes do BGA 771 apresentou atividade biológica, demonstrada pelo seu efeito anti-proliferativo sobre culturas de melanoma B16F10, enquanto apenas a enzima da casca do BGA 772 apresentou esse efeito. Os resultados demonstraram que existe variabilidade de características cinéticas, bem como, de atividades biológicas dentro da mesma espécie e da mesma variedade genética de abacaxi. Dessa forma, os abacaxizeiros estudados representam fontes potenciais para a exploração da indústria farmacêutica, necessitando-se, no entanto, de estudos mais aprofundados, variando-se as concentrações de bromelina, a fim de se identificar a melhor condição de inibição, *in vitro*, bem como realizando-se estudos *in vivo*.