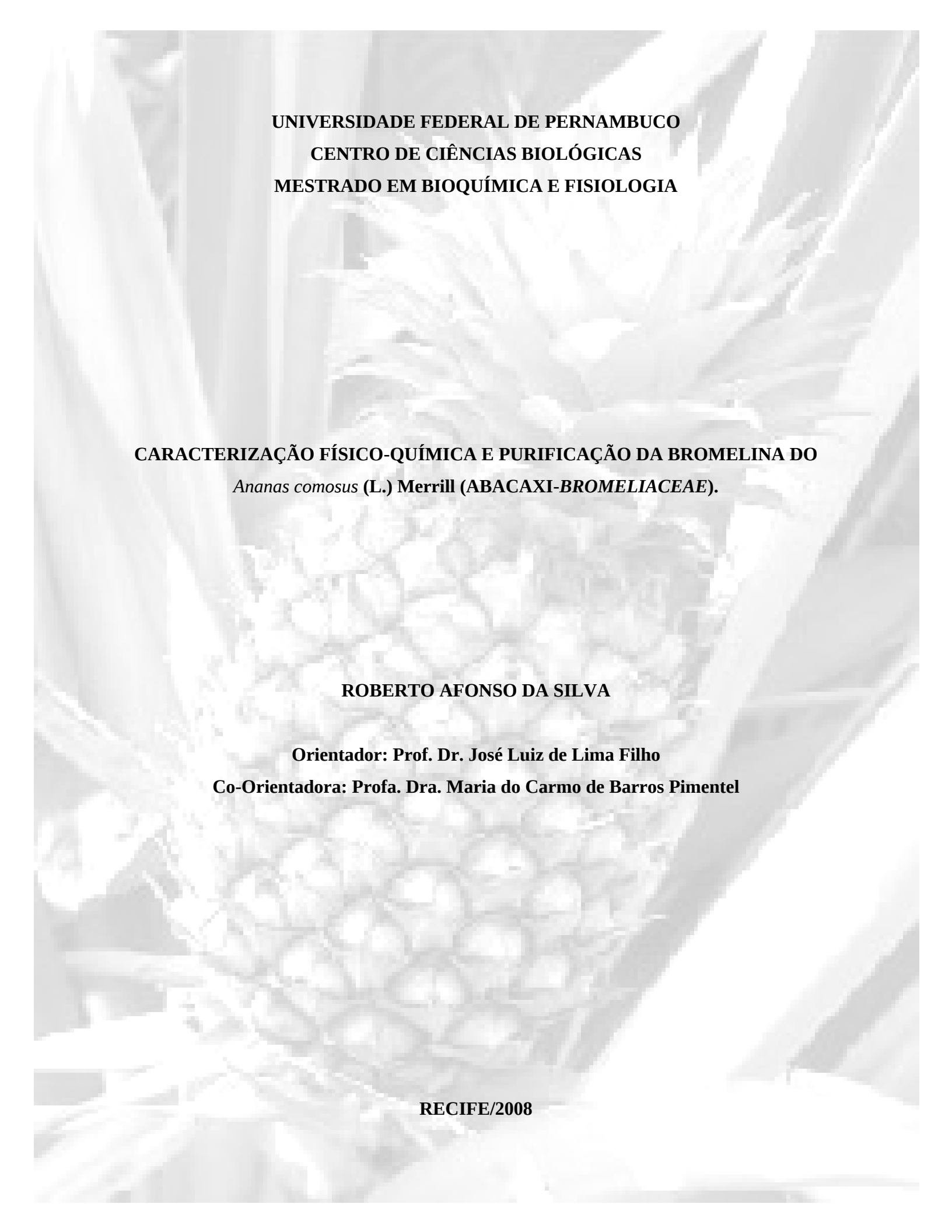




**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA**

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E PURIFICAÇÃO DA BROMELINA DO
Ananas comosus (L.) Merrill (ABACAXI-BROMELIACEAE).

ROBERTO AFONSO DA SILVA

Orientador: Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

Co-Orientadora: Profa. Dra. Maria do Carmo de Barros Pimentel

RECIFE/2008

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E PURIFICAÇÃO DA BROMELINA DO
Ananas comosus (L.) Merrill (ABACAXI-BROMELIACEAE).

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das
exigências para obtenção do
título de mestre em Bioquímica e
Fisiologia pela Universidade
Federal de Pernambuco

Aprovado por: Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho
Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Profa. Dra. Valdinete Lins da Silva
Profa. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha

Data: 29/02/2008

Silva, Roberto Afonso da.

**Caracterização físico-química e purificação da bromelina do
Ananas comosus (L.) Merrill (Abacaxi-*Bromeliaceae*) / Roberto
Afonso da Silva. – Recife: O Autor, 2008.**

68 folhas. il.,fig., tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
CCB. Bioquímica e Fisiologia.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Bromelina. 2. *Ananas comosus*. 3. Enzimas Proteolíticas. 4.
Abacaxí. I. Título.

**582.564
584.85**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
CCB – 2008-71**

Ata da defesa de dissertação do Mestrando **Roberto Afonso da Silva**, realizada em 29 de fevereiro de 2008, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia da UFPE.

Às 14:20 horas, do dia vinte e nove de fevereiro de 2008, foi aberto, na Sala de Aulas do LIKA, o ato de defesa de dissertação do mestrando Roberto Afonso da Silva, aluno do Curso de Mestrado em Bioquímica e Fisiologia/CCB/UFPE. Iniciando os trabalhos a Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho fez a apresentação do aluno, de seu orientador, ele próprio, bem como da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: José Luiz de Lima Filho, na qualidade de Presidente, Maria das Graças Carneiro da Cunha, ambos do Depto. de Bioquímica/UFPE, Valdinete Lins da Silva, do Depto. de Engenharia Química/UFPE e Ana Lúcia Figueiredo Porto, do Depto. de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE. Após as apresentações, o Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho convidou o aluno para a apresentação de sua dissertação intitulada: **“Caracterização físico-química e cinética, e purificação da Bromelina do fruto presente no *Ananas comosus* (L.) Merrill (Abacaxi – Bromeliaceae)”**, e informou que de acordo com o Regimento Interno do Curso, a candidata dispõe de até 50 (cinquenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de arguição para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pela aluna para responder às perguntas será de 30 (trinta) minutos. A aluna procedeu à explanação e comentários acerca do tema em **30 (trinta) minutos**. Após a apresentação do mestrando, o Sr. Presidente convidou a Banca Examinadora para ocupar seus lugares e passou a palavra ao primeiro examinador, Profa. Dra. Valdinete Lins da Silva, que agradeceu ao convite, fez alguns comentários e sugestões, iniciando sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita. Em seguida o Sr. Presidente passou a palavra para a Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto que agradeceu o convite, fez alguns comentários e sugestões, e iniciou sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita. Continuando, o Sr. Presidente passou a palavra para a Profa. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha, que agradeceu o convite, fez alguns comentários e sugestões, e iniciou sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita. Em seguida, o Sr. Presidente, na qualidade de orientador, usou da palavra para tecer alguns comentários a respeito do trabalho do aluno, agradecer à Banca Examinadora e parabenizar o candidato. Finalmente, a sessão foi suspensa para proceder ao julgamento pela Banca Examinadora, a qual permaneceu no local. Após alguns comentários, a Banca decidiu, por unanimidade, conceder a menção **“Aprovado”**. Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Secretário, e demais membros da Banca Examinadora. Recife, 29 de fevereiro de 2008.

Roberto Afonso da Silva
Maria das Graças Carneiro da Cunha
Valdinete Lins da Silva
Ana Lúcia Figueiredo Porto
José Luiz de Lima Filho

*Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos,
e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine.*

*E ainda que eu tivesse o dom da profecia,
e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência,
e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes,
e não tivesse amor, nada seria.*

*E ainda que eu distribuísse toda a minha fortuna para sustento dos pobres,
e ainda que entregasse o meu corpo para ser queimado,
e não tivesse amor, nada disso me aproveitaria.*

*O amor é sofredor, é benigno;
o amor não é invejoso; o amor não trata com leviandade,
não se ensoberbece. Não se porta com indecência,
não busca os seus interesses,
não se irrita, não suspeita o mal;
não folga com a injustiça, mas folga com a verdade;
tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta.
O amor nunca falha.*

I CORÍNTIOS, 13 - 1,8

“Devemos ser espiões da natureza... crescermos como
árvores, correremos como rios e voarmos como águias”

Aos Meus pais Ana Lúcia da silva e Francisco Afonso da silva, que na longa jornada da vida desde o nascimento até os dias de hoje vem me guiando e ensinando os caminhos a serem trilhados sempre com perseverança, humildade, vontade de lutar e fé em Deus.

Dedico

ÍNDICE ANALÍTICO

AGRADECIMENTOS	I
LISTA DE FIGURAS	II
LISTA DE TABELAS	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Abacaxi	3
2.1.1. Botânica, Descrição da Planta, Variedades	3
2.1.2. Composição Química do Abacaxi	4
2.1.3. Utilidades do Abacaxi	5
2.2. Bromelina	5
2.2.1. Descrição e Bioquímica da Bromelina	5
2.2.2. Aplicações Farmacológicas da Bromelina	7
2.2.3. Atividade Antitumoral e Antimetastásica.	8
2.2.4. Indução de Citocinas.	9
2.2.5. Atividade Imune	9
2.2.6. Promoção da Absorção de Antibióticos	10
2.2.7. Debridamento de Queimaduras	11
2.2.8. Auxílio na Digestão e Combate a Enteroinfecções e Doenças Inflamatórias Intestinais	11
2.2.9. Agregação Plaquetária e Fibrinólise	12
2.2.10. Ação Antiinflamatória e Redução Preventiva de Edemas.	13
2.2.11. Aplicações Cardiovasculares e Circulatórias	15
2.2.12. Atividade Mucolítica	15
2.2.13. Toxicidade, Efeitos Colaterais e Reações Alérgicas da Bromelina	16
2.2.14. Aplicação na Indústria de Alimentos e Outras Indicações	17
2.2.15. Por que as Bromeliáceas Produzem a Bromelina	18
3. OBJETIVOS	19
3.1. Objetivo Geral	19
3.2. Objetivos Específicos	19
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
5. ARTIGO	35

5.1. Abstract	36
5.2. Introduction	37
5.3. Materials and Methods	39
5.4. Results and Discussion	44
5.4. Conclusions	49
5.6. Acknowledgments	50
5.7. References	50
 6. CONCLUSÕES	 66
 7. ANEXOS	 68
7.2. Resumos em Congressos	68

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, pois é a suprema razão que permite a existência do meu ser.

A meus pais por toda a dedicação e educação que me passam até os dias de hoje, pois sem o grande apoio deles seria mais difícil ainda superar esta nova etapa da vida e chegar até este momento.

A meus avós, minha irmã e aos meus tios.

A toda minha família pelo apoio que vem me dando.

A meus orientadores em especial Prof. José Luiz e Profa. Carminha que com sua dedicação ao ensino e a pesquisa vem me mostrando e incentivando com carinho para o despertar de uma carreira científica.

A todos os professores da UFPE, e aos amigos do Mestrado em Bioquímica e Fisiologia, em especial Ariele e Diego pelos momentos compartilhados.

A Kilma Paz pela dedicação, atenção e esforço.

Aos dirigentes do LIKA, seus funcionários e sua comunidade como um todo.

Aos amigos e companheiros de estágio do Laboratório de Biotecnologia em especial.

A minha namorada, noiva e hoje esposa que vem me acompanhando, até os dias atuais .

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Em fim a todos que contribuíram direta e indiretamente, que pela mínima ajuda que deram, contribuíram para minha chegada até aqui.

LISTA DE FIGURAS

- Figure 1** - Effect of pH on bromelain activity. The percent relative activity was calculated by considering the activity at pH 8.5 as 100% for (CE) and pH 7.2 as 100% for (CED 80%). Standard deviations were ± 2.0 % (based on three replicates). 57
- Figure 2** - Effect of temperature on bromelain activity. The percent relative activity was calculated by considering the activity at 50°C as 100% for (CE) and pH 50 as 100% for (CED80%). Standard deviations were ± 2.0 % (based on three replicates). 58
- Figure 3** - Effects of pH on the stability of the bromelain. Percent residual activity was measured at pH 8.5 for (CE). The activity of the enzyme before incubation was taken as 100%. Standard deviations were ± 2.0 % (based on three replicates). 59
- Figure 4** - The temperature stability of bromelain (CE). Percent residual activity was mensured at pH 8.5 for (CE). The activity of the enzyme before incubation was taken as 100%. Standard deviations were ± 2.0 % (based on three replicates). 60
- Figure 5** - Gel filtration chromatography for (CED80%) using FPLC system. Fractions of 1.5 mL were collected and assayed for proteins content and protease activity. Flow rate = 0.5 mL m^{-1} . 61
- Figure 6** - Anion-Exchange Chromatography of P2 (10.5mL) fractions, with proteolytic activity, dialyzed and liophylized from gel-filtration chromatography assay using FPLC system. Fractions of 1.5 mL were collected and assayed for proteins content and protease activity. Flow rate = 1.0 mL m^{-1} . 62
- Figure 7** - (A) SDS-PAGE (15%) of fruit bromelain from pineapple. Lane 1: standard protein markers of different molecular weights, Lane 2: crude extract (CE) showing four bands after Coomassie brilliant blue staining. (B) Zymogram of CE in SDS-PAGE, showing two bands with proteolityc activity. 63
- Figure 8** - SDS-PAGE (15%) of fruit bromelain from pineapple. Lane 1: standard protein markers of different molecular weights, Lane 2: Peak (P2) of gel-filtration 64

chromatography, showing two bands after Coomassie brilliant blue staining.

Figure 9 - (A) SDS-PAGE (15%) of fruit bromelain from pineapple. Lane 1: standard protein markers of different molecular weights, Lane 2: Purified fruit bromelain after gel-filtration chromatography combined with anion-exchange chromatography showing single band after Coomassie brilliant blue staining, molecular weight value (29 kDa). (B) Zymogram of CE in SDS-PAGE, showing single band with proteolytic activity.

65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição Química Média do Abacaxi (<i>Ananas comosus</i>)	4
Tabela 2- Bromelina Cisteína Proteinase do Abacaxi (<i>Ananas comosus</i>)	7
ARTIGO	
Table 1 - Purification fruit bromelain of <i>Ananas comosus</i> L. Merrill (pineapple)	54

RESUMO

Bromelina é o nome genérico dado ao grupo de enzimas proteolíticas encontrada nos vegetais da família *Bromeliaceae*, da qual o abacaxi é o mais conhecido e rico nesta protease, que tem grande importância na área de saúde e de alimentos. O objetivo deste trabalho foi determinar as propriedades físico-químicas e purificar a bromelina presente no *Ananas comosus* L. Merrill (abacaxi). A Diálise seguida da precipitação com 80% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ realizado no extrato do abacaxi proporcionou uma maior recuperação de atividade e proteína produzindo um fator de purificação cerca de 3 vezes. O CE e o CED80% apresentaram valores de pH ótimos de 8,5 e 7,2, respectivamente. Entretanto a bromelina foi estável em todos os valores de pH testados (5,0-9,0) mostrando assim ser formada por diferentes frações proteolíticas. Em relação à temperatura ótima, o CE e o CED80% apresentaram valor de 50°C e foram estáveis até temperaturas de 60 °C, sendo totalmente desnaturada a 80°C após 30 minutos. Os valores de K_M e V_{max} aparentes, calculados segundo modelo de Lineweaver-Burk, foram: para azocaseína - $K_M = 2,48 \text{ mg/ml}$ e $V_{max} = 35,29 \text{ U/mL}$ e para azoalbumina - $K_M = 2,94 \text{ mg/ml}$ e $V_{max} = 11,11 \text{ U/mL}$, mostrando assim praticamente a mesma afinidade por ambos os substratos. Entretanto a eficiência catalítica foi maior para azocaseína que para azoalbumina ($31,62$ e $8,39 \text{ min}^{-1}$, respectivamente). Através da eletroforese em gel SDS-PAGE, o extrato bruto apresentou 4 bandas de proteínas com massas moleculares de 40, 29 e 27 kDa e uma inferior a 14 kDa. Através de zimograma as bandas de 29 e a abaixo de 14kDa apresentaram atividade caseinolítica. A Cromatografia de gel-filtração apresentou 2 picos, entretanto apenas o pico 2 com atividade proteolítica específica de 116 U/mg de proteína e purificação de 25,1 vezes, o qual apresentou 2 bandas de 29 e 26 kDa em gel SDS-PAGE. Pico 2 este quando aplicado na cromatografia de troca aniônica, rendendo um maior pico (P1) com atividade proteolítica o qual apresentou banda única em SDS-PAGE de 29 kDa com atividade caseinolítica comprovada em zimograma.

Palavras-Chave: Bromelina; purificação; FPLC; enzimas proteolíticas

ABSTRACT

Bromelain is the name of enzymatic complex of proteases from pineapple which is the most important fruit from *Bromeliaceae* used as medicinal plant and food. The objective of this work was studying the purification and the physico-chemical and kinetic properties, and purification of the fruit bromelain from *Ananas comosus* L. Merryl (pineapple). The crude extract (CE) was partially purified by dialyses and 80% (w/v) ammonium sulphate saturation (CED80%) showed 3.39-fold purification with activity recovery of 289% and specific activity of 18.25 U/mg of protein. Both CE and CED80% enzyme preparations presented optimum pH of 8.5 and 7.2, respectively and optimal temperature of 50°C. The bromelain exhibited thermal stability up to 60°C and was stable at large range of pH (5.0-9.0). Kinetic studies revealed similar activity for azocasein and azoalbumin substrates (K_m of 2.48 and 2.94 mg/mL, respectively), but different catalytic efficiencies (31.62 min^{-1} for azocasein and 8.39 min^{-1} for azoalbumin). The molecular weight of the CE was estimated by SDS-PAGE, showing four bands: 40kDa, 29kDa, 27kDa and one band of low molecular weight smaller than 14kDa. The Zymogram revealed two caseinolytic bands, 29kDa and smaller 14kDa. The Gel-filtration chromatography of CED80% preparation showed active peak (P2), which presented a high specific activity (116 U/mg protein) and purification fold (25.1), with two bands in SDS-PAGE of 29 e 27kDa, respectively. The cation-exchange chromatography of CED80% was unsuccessful in the separation, while the active peak (P2) sample was purified by anion-exchange chromatography producing a single peak (P1), which showed single band in SDS-PAGE of 29kDa. This result proved that the purification steps of fruit bromelain produced a quite homogeneous enzyme preparation.

Key-Words: Bromelain; Purification; *Ananas comosus*, Cysteine protease

1. INTRODUÇÃO

Bromelina é o nome genérico dado ao extrato de proteinases extraída dos vegetais da família *Bromeliaceae*, do qual o abacaxi é o mais conhecido e rico nesta protease. Constitui uma extraordinária mistura de diferentes cisteína-endopeptidases, e outros componentes como fosfatases, glucosidases, peroxidases, celulases, glicoproteínas e carboidratos além de vários inibidores de proteases (COOREMAN, 1978; ROWAN *et al.*, 1990). Pode ser extraída de diversas partes do abacaxi: polpa, talo, caule, folhas e raízes. Destacam-se a bromelina do talo (E.C. 3.4.22.32), ananaina (E.C. 3.4.22.31), comosaina e a bromelina do fruto (E.C. 3.4.22.33) com semelhantes pesos moleculares (NAPPER *et al.*, 1994; LEE *et al.*, 1997; HARRACH *et al.*, 1998). Na indústria de alimentos, a bromelina pode ser utilizada na formulação de amaciantes de carnes vermelhas; na produção de ovos desidratados; na preparação de leite de soja e isolados protéicos; na hidrólise de certos complexos proteína-taninos, formados durante a fermentação, que se presentes na cerveja, tornam-se insolúveis e formam turvações quando gelada; na produção de pães e biscoitos a partir de farinhas de trigo de alto teor protéico (DIAZ, 1988; SCHMITT, 1994; GAMS, 1976; COLE, 1973). Na medicina é utilizada na digestão de vermes, como *ascaris* e *trichuris*; no bloqueio a invasão dos macrófagos por *Salmonella typhimurium*, na inibição de secreção de toxinas pelo *Vibrio cholerae* e *Escherichia coli*; na remissão dos sintomas em pacientes com retocolite ulcerativa; na suturação de feridas, nas queimaduras principalmente as de 3º grau; como anti-inflamatório de origem vegetal em cirurgias e por último, tem sido estudado sua eficiência na inibição do desenvolvimento de células cancerígenas (HALE *et al.*, 2005; GRABOVAC & BERNKOP-SCHNURCH, 2006; MAURER & ECKERT, 1999). Atualmente a bromelina é obtida através da centrifugação, ultrafiltração e liofilização do suco de abacaxi esfriado. O processo da origem a um pó amarelado cujo a atividade enzimática pode ser determinada com diferentes substratos como caseína, gelatina ou tripeptídeos cromogênicos. Em solução aquosa a bromelina se deteriora rapidamente por auto-digestão. Porém a adição de soro que contenha alfa-2-macroglobulina ($\alpha 2M$) previne sua autodigestão (FILIPOVA *et al.*, 1984; HARRACH *et al.*, 1995).. A bromelina atua primariamente por ação proteolítica direta, hidrolisando ligações peptídicas, preferencialmente onde forem encontrados resíduos de alanil, glicil e leucil, atuando sobre substratos diversos. Esta ação proteolítica ocorre sobre proteínas

solúveis, assim como sobre proteínas estruturais de membrana, principalmente sobre os receptores e marcadores de superfície. A bromelina possui ainda atividade tiol-redutase, promovendo a ruptura de pontes dissulfeto entre cadeias peptídicas MAURER, 2001, HALE *et al.*, 2002).

Estudos demonstraram que a bromelina, apesar de ser inativada em sua maioria, é absorvida em quantidades fisiologicamente significativas pelo trato gastrointestinal, sendo identificável no plasma por diferentes metodologias, demonstrou que além de absorvida pelos enterócitos, também pode ser detectada em resíduos fecais de ratos, após administração oral, demonstrando que a enzima atravessa todo o trato gastrointestinal.

Preparações da bromelina comercial são avaliadas conforme a atividade proteolítica. A inibição de agregação plaquetária e ação antiinflamatória parecem estar relacionados com a atividade proteásica. Porém, outros efeitos como inibição do crescimento de células tumorais e metastásicas bem como no debridamento de queimaduras estão associados a outros componentes não proteinolíticos contidos no extrato de bromelina (TAUSSIG & BATKIN, 1988). Assim a determinação só da atividade proteolítica não pode ser o suficiente para caracterizar completamente as propriedades farmacológicas da bromelina, visto que a mesma isolada de forma pura do seu extrato e com atividade proteásica específica elevada, não apresenta a mesma propriedade farmacológica quando está em extrato bruto. O seguinte trabalho propõe estudar as características físico-químicas, bem como a purificação da bromelina presente no *Ananas comosus* L. Merrill (abacaxi-bromeliaceae).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ABACAXI.

2.1.1. Botânica/Descrição da Planta/ Variedades.

O abacaxizeiro é classificado como *Ananas comosus* (L. Merrill), monocotiledônea pertencente a família *Bromeliaceae* que é atualmente constituída por cerca de 2663 espécies, distribuídas em 54 gêneros e 3 subfamílias, dentre as quais engloba mais de 1500 espécies somente no Brasil (Paula & Silva, 2004). A denominação na linguagem tupi-guarani para o abacaxi é "**inaka'ti**" ("**iuaka'ti**") ou "fruta cheirosa". Em língua espanhola é conhecido como "piña", no inglês "pineapple" e "ananás" por franceses, italianos, holandeses, alemães. Originário da América do Sul, foi levado para a Europa logo após o descobrimento da América. Seu cultivo disseminou-se por vários países devido a grande aceitação do fruto pelos consumidores, justificada pelo atraente sabor e equilíbrio entre ácidos e açúcares (BARTOLOMÉ *et al.* 1995; CANECCHIO FILHO, 1973). Tailândia, Filipinas, Brasil, China e Índia destacam-se como os principais países produtores .

Planta perene, arbusto baixo, tem raízes profusas pequenas que alcançam até 15 cm de profundidade, caule (haste) com gemas (cicatrizes de folhas) que garantem a reprodução da planta. Folhas planas, esverdeadas, com parte superior em calha dispostas em espiral em torno da haste central que, no termino do desenvolvimento, dá origem a 150 a 200 flores brancas ou branco-roxas em espigas. Estas originam 100-200 frutos pequenos (bagas), com pontas na casca, colados entre si e dispostos em torno do eixo central (coração). O fruto inteiro (infrutescência) tem forma cilíndrica ou cônica (frutos maiores na base), com rebentos na base e coroa de folhas no ápice. A polpa do fruto é sucosa, aromática, saborosa, com leve acidez, cor branca, amarela ou laranja-avermelhada, sendo o peso médio dos frutos de um quilo, dos quais 25% é representado pela coroa (GIACOMELLI, 1981). Basicamente, no Brasil o terceiro maior produtor mundial de abacaxi, cultivam-se as variedades **Pérola**, a preferida pelo mercado *in natura*, e **Smooth Cayenne** ou **Havaiana**, que produz um fruto maior, mais ácido e resistente e que, por isso mesmo, é normalmente destinada à exportação e às indústrias de compotas e de sucos.

2.1.2. Composição Química do Abacaxi

A composição varia muito de acordo com a época em que é produzido, do estágio de maturação e de fatores agronômicos e ambientais (BARTOLOMÉ *et al.*, 1995). A composição química do abacaxi apresenta 89,9% de água, 0,3% de proteínas, 0,5% de lipídios, 5,8% de glicídios, 3,2% de celulose e 0,3% de sais (FRANCO, 2001). Na **tabela-1** temos mais detalhes de sua composição química.

Tabela 1- Composição Química Média do Abacaxi (*Ananas comosus*).

COMPONENTES	Quantidade (por 100 gramas)
Glicídio	13,70 g
Proteínas	0,40 g
Lipídios	0,20 g
Cálcio	18,00 mg
Ferro	0,50 mg
Fósforo	8,00 mg
Fibras	0,4 g
Niacina	0,2 mg
Ácido ascórbico	33,46 mg
Tiamina	0,08 mg
Riboflavina	0,02 mg
Retinol	0,05 mg
Calorias	52,00 Kcal

O abacaxi atua como coadjuvante na digestão (HALE *et al.*, 2006; FRANCO e CHALOUB, 1992) em virtude da presença da bromelina. Tal enzima proteolítica atua clivando as proteínas, tanto em meio ácido, como alcalino e neutro. O fruto destaca-se pelo valor energético, devido à sua alta composição de açúcares, e valor nutritivo pela presença de sais minerais (cálcio, fósforo, magnésio, potássio, sódio, cobre e iodo) e de vitaminas (C, A, B1, B2 e Niacina). Excede a laranja em ferro, contendo quatro vezes mais cálcio do que o trigo integral. Seu consumo é recomendado para crianças, dada a importância desses minerais na formação do sangue e dos ossos (FRANCO e CHALOUB, 1992; FRANCO, 2001).

2.1.3. Utilidades do Abacaxi

As cascas e centros do fruto provenientes das indústrias de conservas podem ser utilizados para fazer calda (empregada nas conservas em lata), para o processamento de vinagre, de geléias, de combustível e para a obtenção de celulose (BOBBIO e BOBBIO, 1992; VARNAM e SUTHERLAND, 1997). Várias pesquisas têm sido desenvolvidas para o aproveitamento dos resíduos do abacaxi. Sreenath *et al.* (1994) utilizaram enzimas comerciais (celulase e pectinase) para a extração do suco a partir dos resíduos. Já Tanaka *et al.* (1999) empregaram os resíduos como substrato de baixo custo para produção de etanol por fermentação. O suco pasteurizado ou fresco é utilizado em refrescos, sorvetes, bombons, confeitos, ácido cítrico, ponche, creme, bala, geléia, licor, farinha, vinho e aguardente (CANECHIO, 1973; FRANCO, 2001; VARNAM e SUTHERLAND, 1997). Possui ainda grande aplicabilidade medicinal, devido a enzima bromelina.

2.2. BROMELINA.

2.2.1. Descrição e Bioquímica da Bromelina.

O abacaxi sempre foi usado como uma planta medicinal em várias culturas nativas, mas a bromelina só foi quimicamente conhecida em 1876. Entretanto, como produto farmacêutico industrial, a bromelina foi inicialmente manufaturada em 1956 no Havaí. Desde então, inúmeros trabalhos científicos foram dedicados à descrição de diversas atividades farmacológicas desta protease (MAURER, 2001; HALE *et al.*, 2002).

Bromelina é o nome dado ao extrato de proteinases extraída dos vegetais da família *Bromeliaceae* (RABELO *et al.*, 2004), cujo o abacaxi é a mais rica fonte desta protease (GUPTA, *et al.*, 2003; HEBBAR *et al.*, 2007). Constitui uma extraordinária mistura de diferentes tiol-endopeptidases (HAQ *et al.*, 2005), e outros componentes como fosfatases, glucosidases, peroxidases, celulasas, glicoproteínas e carboidratos (COOREMAN, 1978; ROWAN *et al.*, 1990), além de vários inibidores de proteases (LENARCIC *et al.*, 1992; HATANO *et al.*, 1996). Recentemente o extrato de bromelina comercial apresentou também atividade quitinase e quitosanase (HUNG *et al.*, 2002, SAN-LANG, *et al.*, 2007). Este complexo enzimático pode ser extraído de diversas partes do abacaxi: polpa, talo, caule, folhas e raízes (BABU *et al.*, 2008). Pela **tabela-2**, destacam-se a bromelina do talo (E.C. 3.4.22.32), ananaina (E.C. 3.4.22.31),

comosaina e a bromelina do fruto (E.C. 3.4.22.33), com pesos moleculares em torno de 23 a 24 kD (NAPPER *et al.*, 1994; LEE *et al.*, 1997; HARRACH *et al.*, 1998).

Atualmente a bromelina é preparada através da centrifugação, ultrafiltração e liofilização do suco de abacaxi resfriado. O processo da origem a um pó amarelado cuja atividade enzimática pode ser determinada com diferentes substratos como caseína, gelatina ou tripeptídeos cromogênicos (FILIPOVA *et al.*, 1984; HARRACH *et al.*, 1995). Em solução aquosa a bromelina se deteriora rapidamente por auto-digestão, porém a adição de soro que contenha alfa-2-macroglobulina (**$\alpha 2M$**) previne sua autodigestão. Através do método de alta resolução, “Fast Protein Liquid Chromatography” (FPLC) e outros métodos bioquímicos, bromelina do talo, ananaina e comosaina e tiol-proteinases ácidas, foram isoladas do extrato bruto de bromelina, em seguida foram parcialmente ou completamente seqüenciados e caracterizados (HARRACH *et al.*, 1995.; NAPPER *et al.*, 1994). As enzimas do complexo bromelina incluem principalmente espécies glicosiladas de enzimas múltiplas, com diferentes atividades proteolíticas e ponto isoelétrico entre 4,6 e 10. Duas principais proteinases básicas F₄ e F₅ foram caracterizadas mais adiante com massas moleculares de 24.397 e 24.472 Da, respectivamente (HARRACH *et al.*, 1995).

Diferentes frações protéicas foram obtidas por meio eletroforese SDS-PAGE e focalização isoelétrica. Por exemplo, a proteinase cuja fração foi cerca de 15 vezes mais ativa, foi chamada de F₉, que abrange aproximadamente 2% das proteínas totais, não possui nenhuma glicosilação e tem massa molecular de 23.427 Da. Foi calculado que, 50% das proteínas em F₄ e F₅ são glicosiladas. Os valores de pH ótimo para as frações F₄ e F₅ estão entre 4,0 e 4,5 e para F₉, próximo ao pH neutro. O extrato contendo todas as frações de bromelina mostrou atividade em uma gama de pH que variou de 4,5 a 9,8 (HARRACH *et al.*, 1995; NAPPER *et al.*, 1994; LEE *et al.*, 1997).

A bromelina atua primariamente por ação proteolítica direta, hidrolisando ligações peptídicas, preferencialmente onde forem encontrados resíduos de alanil, glicil e leucil. Esta ação proteolítica ocorre sobre proteínas solúveis, assim como sobre proteínas estruturais de membrana, principalmente sobre os receptores e marcadores de superfície (MAURER, 2001, HALE *et al.*, 2002). A bromelina possui ainda atividade tiol-redutase, promovendo a ruptura de pontes dissulfeto entre cadeias peptídicas (MAURER, 2001).

A bromelina atualmente vem sendo utilizada em métodos de imobilização em diversos suportes, com isso ganha-se um aumento em sua estabilidade térmica e temperaturas de inativação, bem como o aumento da faixa de atividade proteolítica em pH ácido (YODOYA *et al.*; 2003; SHI *et al.*; 2007; GUPTA *et al.*, 2007)

Preparações da bromelina comercial são avaliadas conforme a atividade proteolítica. Entretanto, supõe-se que inibição da agregação plaquetária e ação antiinflamatória podem estar relacionadas com a atividade proteásica. Porém, outros efeitos como inibição do crescimento de células tumorais e causadoras de metástase, bem como no debridamento de queimaduras estão associados a outros componentes não-proteinolíticos que estão contidos no extrato de bromelina. Assim, a determinação só da atividade proteolítica não é suficiente para caracterizar completamente as propriedades farmacológicas da bromelina (TAUSSIG & BATKIN, 1988).

Tabela 2- Bromelina Cisteína Proteinase do Abacaxi (*Ananas comosus*).

Nome	P.M	P.I	Seqüência	Glicosilação	Fonte
Bromelina do talo (EC 3.4.22.32)	23.800 Da	10	212aa	+	Harrach, 1998
Ananaina (EC 3.4.22.31)	23.427Da	10	216aa	-	Harrach, 1998 Lee, 1997
Comosaina	24.509 Da 23.550 Da	10 4.8	-	+ ++	Harrach, 1998 Napper, 1994
Bromelina do Fruto (EC 3.4.22.33)	28.000 Da 31.000 Da	4.6	-	-	Cooreman, 1978 Yamada, 1976

Abreviação: EC: enzyme comission ; P.M: peso molecular; P.I: ponto isoelétrico; aa: aminoácidos

2.2.2. Aplicações Farmacológicas da Bromelina

De uma variedade de experimentos *in vitro* e *in vivo* utilizando animais, principalmente roedores, como também de observações clínicas, baseados em estudos controles, as propriedades gerais da bromelina podem ser resumidas segundo:

(HALE *et al.*, 2005; GRABOVAC & BERNKOP-SCHNURCH, 2006; MAURER & ECKERT, 1999).

- Propriedades de prevenção da formação de edema e diminuição de edema já existente.
- Reduzir o nível de fibrinogênio no sangue.
- Ativar a fibrinólise.
- Ativar a plasmina.
- Prevenir a agregação plaquetária.
- Prevenir a adesão das plaquetas e de células endoteliais dos vasos sanguíneos.
- Reduzir o nível prostaglandinas E_2 e de tromboxanos A_2 nos exudatos da inflamação aguda.
- Atuar como agente antiinflamatório.
- Induz a secreção de interleucina (II-1, II-6, II-8) e fator de necrose tumoral (FNT- α) de monócitos e granulócitos do sangue.
- Aumenta a permeabilidade tecidual a drogas antibióticas.
- Previne as metástases tumorais em modelos murínicos.
- Inibe o crescimento de células tumorais *in vitro*.
- Aumenta a atividade imune contra células tumorais.
- Diminui a adesividade das células tumorais.
- Ajuda no debridamento de queimaduras.
- Aumenta a permeabilidade da membrana intestinal na captação de heparina.
- Auxílio digestivo.
- Atua como agente mucolítico, diminuindo a viscosidade e aumentando a fluidez, facilitando a eliminação das secreções respiratórias.

Alguns dos efeitos da bromelina, podem resultar de sua capacidade de alterar e modular estruturas de superfície de células distintas, através de seus peptídeos livres. Assim a modificação bromelina-mediada por moléculas de adesão em plaquetas e em outras células tumorais normais e malignas, podem inibir sua agregação. A dissolução dos componentes de membrana da célula e os efeitos dos componentes de processos homeostáticos podem explicar os fenômenos fibrinolíticos (HALE E HAYNES, 1992).

2.2.3. Atividade Antitumoral e Antimetástasica.

O primeiro relato documentado do uso oral de bromelina em pacientes com câncer é de 1972. Doze pacientes com tumores ovarianos e nas mamas tomaram diariamente 600 mg de bromelina durante 6 meses, ocorrendo uma diminuição das massas cancerosas e uma diminuição

da metástase, melhorando a sobrevida com baixos índices de efeitos colaterais (GERARD, 1972; NIEPER, 1974). Estudos posteriores demonstraram que a bromelina apresenta efeito inibitório sobre o crescimento de diversas linhagens tumorais *in vitro* (GARBIN *et al.*, 1994; GRABOWSKA *et al.*, 1997; KALRA *et al.*, 2008). Bromelina em doses de mais de 1000 mg diariamente, foi combinado com agentes quimioterápicos, resultando em uma regressão do tumor (GERARD, 1972; NIEPER, 1976). Bromelina também diminuiu, metástases pulmonares, em teste com células cancerígenas implantadas em pulmão de ratos. Este potencial antimetastático foi demonstrado para ambas bromelina, ativa e inativa, com ou sem propriedades proteolítica e anticoagulante (BATKIN, 1988; TAUSSIG, 1985).

2.2.4. Indução de Citocinas.

A iniciação, bem sucedida de uma resposta imune depende de células T e macrófagos, junto com a produção dos fatores polipeptídicos, chamados de citocinas, que desempenham um papel chave na comunicação durante a resposta imunológica normal, como também na infecciosa, inflamatória e estados neoplásico de doenças.

Bromelina e papaína, demonstraram induzir a produção de citocinas em células mononucleares periféricas do sangue. O Tratamento *in vitro* levou a produção de elevadas quantidades de fator de necrose tumoral alfa (FNT- α) e interleucinas (IL-1 β , IL-2 e IL-6), (DESSER E REHBERGER, 1990; DESSER *et al.*, 1994). Interferon-alfa (IFN- α) e interferon-gama (IFN-gama) sozinhos não tiveram efeitos, porém aumentou a produção de FNT- α quando aplicado junto com as enzimas. A habilidade para induzir a produção de citocinas pode explicar os efeitos de antitumorais observados depois da administração oral de preparações de polienzimas.

2.2.5. Atividade Imune

A interação de linfócitos com qualquer endotélio especializado de órgãos linfóides ou células endoteliais ativadas representa o primeiro passo crítico para a migração dos linfócitos até o interior dos tecidos linfóides ou locais de inflamação (MUZING, 1995).

Foi mostrado que bromelina remove moléculas do receptor CD44 em células-T de linfócitos. Ambas, a bromelina bruta e a protease F₉ purificada da bromelina, reduziu a expressão de CD44, mas F₉ era 10 vezes mais ativa que a bromelina bruta, onde 2,5 μ g/ml inibiu

aproximadamente 97 % da expressão de CD44 (MUZING, 1995). Outros relatos também descrevem a remoção de marcadores de superfície celular em leucócitos, alterando a capacidade de adesão celular, importante na regulação da atividade das células imunes (MYNOTT *et al.*; 1999; HALE *et al.*; 2002; RALF *et al.*, 2007).

2.2.6. Promoção da Absorção de Antibióticos

A Bromelina pode modificar a permeabilidade de órgãos e tecidos a diferentes drogas, prolongar o tempo de dormência em camundongos após administração de pentobarbital e aumentar os níveis de penicilina e gentamicina em ratos (MOSS *et al.*;1963). Em humanos, foi relatado aumento nos níveis de antibióticos no sangue e na urina (TAUSSIG & BATKIN 1988) e aumentos nos níveis de tetraciclina e amoxicilina quando são administrados simultaneamente com a bromelina (TINOZZI & VENEGONI, 1978).

O Tratamento com 18 mulheres utilizando 80 mg de bromelina combinada com amoxicilina e tetraciclina resultou um aumento em nível plasmático de ambos os antibióticos quando comparados com o grupo controle (LUERTI & VIGNALI, 1978). Em um experimento duplo-cego foi demonstrado um aumento no nível de tetraciclina no soro depois da ingestão oral de 540 mg de bromelina (RENZINI & VARENGO, 1972).

Quarenta e oito pacientes com sinusite aguda foram submetidos à terapia clássica, o qual incluiu antihistamínicos e agentes analgésicos, juntamente com antibióticos específicos. Vinte três dos pacientes receberam bromelina quatro vezes ao dia, enquanto os outros 25 receberam o placebo. Dos pacientes que receberam bromelina, 83% tiveram resolução completa de inflamação da mucosa nasal contra 52% do grupo de placebo. Melhoria na respiração aconteceu em 78% dos que receberam a bromelina contra 68% que receberam o placebo. Apenas 40% do grupo de placebo tiveram um resultado semelhante com respeito a inflamação, enquanto 53% mostraram resolução da dificuldade respiratória (RYAN, 1967).

A potencialização de antibióticos e outras curas através da bromelina podem estar relacionadas ao aumento da absorção, como também ao aumento da permeabilidade do tecido doente, aumentando assim, a passagem do antibiótico para o local da infecção. Estima-se também que o uso de bromelina pode promover uma passagem similar para os componentes específicos e não-específicos do sistema imune, fazendo com que o corpo utilize seus próprios recursos curativos.

2.2.7. Debridamento de Queimaduras

A remoção de tecidos desvitalizados é um mecanismo eficaz de combate à morbimortalidade em pacientes com fascíte, abscessos e queimaduras de terceiro grau. O debridamento químico, em comparação ao cirúrgico, remove seletivamente apenas os tecidos necrosados.

Bromelina é aplicada em uso tópico como creme (35% de bromelina em base lipídica), podendo ser benéfico na eliminação de queimaduras e na aceleração da cura. Um componente não proteolítico da bromelina denominado de escarase é o responsável por este efeito, e não apresenta nenhuma atividade de enzima hidrolítica, contra substratos protéicos ou vários substratos de glicosaminoglicanos e sua atividade varia grandemente de preparação para preparação (HOUCK *et al.*, 1983).

O uso tópico de bromelina alcançou completo debridamento em queimaduras experimentais em ratos em uma média de 1,9 dias para o completo debridamento, em comparação com collagenase que precisou de 10,6 dias para resultados semelhantes (KLAUE *et al.*, 1979)

O uso tópico do creme de bromelina separa o tecido necrosado na interface com o tecido vivo. É hipotetizado que a bromelina ataca a collagenase em tecido vivo, que em seguida ataca o colágeno desnaturado-o. Isto produz uma delimitação entre tecido vivo e o tecido desvitalizado, podendo assim ser removida a camada desvitalizada resultando uma camada apropriada para enxertos. Com o uso da bromelina, enxertos podem ser realizados 24 horas após o acidente. Utilizando creme de bromelina no tratamento de queimaduras, freqüentemente resulta uma mínima ou nenhuma cicatriz na formação do tecido (AHLE & HAMLET, 1987).

2.2.8. Auxílio na Digestão e Combate a Enteroinfecções e Doenças Inflamatórias Intestinais.

Bromelina foi usada com êxito como uma enzima digestiva nos casos de insuficiência exócrina do pâncreas e outras desordens intestinais. Em virtude de sua ação em um amplo espectro de pH, bromelina tem atividade no estômago, assim como no intestino, mostrando ser uma adequada substituição para pepsina e tripsina em casos de deficiência destas enzimas (KNILL-JONES *et al.*, 1970).

A combinação de biliar bovina, pancreatina e bromelina é eficiente para pacientes com esteatorréia pancreática. Além disso, esta combinação resultou em um ganho em peso na maioria

dos casos, assim como uma sensação subjetiva de bem estar. Melhoria sintomática também era notável em relação à dor e flatulência (BALAKRISHNAN *et al.*, 1981).

Foi relatado que a Bromelina cura úlceras gástricas em experimentos com animais. Em um extenso estudo do efeito da bromelina na mucosa gástrica, foi estabelecido que a bromelina aumentou a captação de enxofre em 50% aproximadamente e glucosaminas de 30-90%. O aumento da captação destas substâncias permite que a mucosa gástrica se cure mais rapidamente pela influência da bromelina (FELTON, 1976).

Em modelo animal, a bromelina promoveu alterações proteolíticas nos receptores k88 de enterócitos de suínos, impedindo a adesão de *E. coli* k88+ enteropatogênica à mucosa intestinal, prevenindo a enteroinfecção na maioria dos animais (CHANDLER E MYNOTT, 1998). A análise bioquímica do soro e o exame histopatológico dos porcos não mostrou nenhum efeito adverso com o tratamento. Portanto, administração de bromelina pode ser benéfico na prevenção de diarreias induzidas por enterotoxinas (MYNOTT *et al.*, 1996). Também é utilizada na digestão de vermes, como *Ascaris* e *Tricuris* (SILVA, 1991).

A bromelina demonstrou *in vitro* capacidade de inibir a secreção de toxinas pelo *Vibrio cholerae* e *Escherichia coli* (MYNOTT *et al.*, 1997) e bloqueou a invasão dos macrófagos por *Salmonella typhimurium* (POSCHET *et al.*, 1999). Em humanos, a administração oral de bromelina promoveu a remissão dos sintomas em pacientes com retocolite ulcerativa (KANE E GOLDBERG, 2000).

Estudos anteriores demonstraram que a bromelina, apesar de ser inativada em sua maioria, é absorvida em quantidades fisiologicamente significativas pelo trato gastrointestinal, sendo identificável no plasma por diferentes metodologias (SEIFERT *et al.*, 1979; KOLAC *et al.*, 1996; CASTELL *et al.*, 1997; MAURER *et al.*, 1996). Hale (2004), demonstrou que além de absorvida pelos enterócitos, a bromelina pode ser detectada em resíduos fecais de ratos, após administração oral, demonstrando que a enzima atravessou todo o trato gastrointestinal.

2.2.9. Agregação Plaquetária e Fibrinólise.

A Bromelina foi administrada oralmente a 20 voluntários com uma história de ataques cardíacos e derrames cerebrais ou com elevados valores de contagem plaquetária. Diminuiu agregação plaquetária em 17 dos voluntários e normalizou valores em 8 dos 9 voluntários que previamente tiveram elevados valores de agregação plaquetária (HEINECKE *et al.*, 1972). Foi

demonstrando em estudos *in vitro* que a bromelina inibi a agregação plaquetária induzida por ADP, epinefrina, como também por precursores de prostaglandinas (MORITA *et al.*, 1979). Outros relatos descrevem o isolamento de frações da bromelina envolvidas na diminuição da agregação plaquetária (AKO *et al.*, 1981; METZIG *et al.*, 1999).

Ratos tratados com bromelina mostraram uma redução do Fator X e da protrombina, ambos que são necessitados para a ativação do fibrinogênio a fibrina pelo caminho comum da cascata extrínseca e intrínseca. Foi mostrado, também que a bromelina estimula a conversão de plasminogênio a plasmina, tendo como resultado um aumento da fibrinólise. Isto minimiza o estase venoso, facilita a drenagem, aumenta a permeabilidade e restaura a continuidade biológica do tecido (TAUSSIG E BATKIN, 1988).

O Plasminogênio, o qual é ativado a plasmina por administração oral de bromelina, mostrou inibir a liberação de ácido aracdônico pelas membranas das células, tendo como resultado um decréscimo da agregação plaquetária e modulação das séries 2 das prostaglandinas (SCHAFER E ADELMAN, 1985). Também é hipotetizado que terapia com bromelina conduz a um aumento relativo de prostaglandinas, PGH₂ e sobre tromboxano A₂ (FELTON, 1980).

Bromelina é um eficiente agente fibrinolítico *in vitro* e *in vivo*; no entanto, devido as antiproteases presentes no plasma, seu efeito é mais evidente em soluções purificadas de fibrinogênio. Uma redução do nível de fibrinogênio no soro de ratos foi observada com a imediata administração de bromelina (LIVIO *et al.*, 1978). A atividade fibrinolítica da bromelina foi atribuída ao aumento da conversão do plasminogênio a plasmina que limita a expansão por degradar a fibrina (DE-GIULI E PIROTTA, 1978).

2.2.10. Ação Antiinflamatória e Redução Preventiva de Edemas.

Bromelina mostrou ter ações diretas e indiretas, envolvendo outros sistemas enzimáticos, na inibição da dor inflamatória em modelos experimentas em ratos (INOUE *et al.*, 1994). Bromelina foi a mais potente das 9 substâncias antiinflamatórias testadas experimentalmente em edemas induzidos em ratos proporcionando redução da inflamação (UHLIG E SEIFERT, 1981; VELLINI *et al.*, 1986; YONEHARA *et al.*, 1987).

A administração de bromelina em 59 pacientes resultou uma redução evidente de dor e inchaço do sistema locomotor (MASSON, 1995). Bromelina foi administrada a 16 pacientes 72 horas antes de sofrerem cirurgia oral. Após 24 horas da cirurgia, 75% dos pacientes tiveram

suaves ou nenhuma inflamação contra 19% do grupo controle (TASSMAN *et al.*, 1965). Em outro estudo de administração da bromelina 48-72 horas antes da cirurgia reduziu o número de dias para completo desaparecimento da dor de 3,5 para 1,5, e desaparecimento da inflamação de 6,9 para 2,0 dias, contra o grupo controle (TASSMAN *et al.*, 1964).

Modelos experimentais animais mostrou que a bromelina foi capaz de diminuir o edema, efeito não conseguido pela papaína, outra cisteína proteinase. Bromelina foi eficaz na prevenção do edema provocado por carragenina em 41% dos animais e em 45% nos edemas provocados por dextrana (NETTI *et al.*, 1972). Além disso bromelina mostrou maior eficácia na prevenção do edema que todas as drogas testadas como, indometacina, acidoacetilsalicílico e oxifenbutazona (UHLIG E SEIFERT, 1981).

Aplicações intraperitoniais (i.p) e orais da bromelina, provou significativa capacidade de reduzir edema. Foi concluído que bromelina aumenta a permeabilidade do tecido através da fibrinólise e promove reabsorção do fluido do edema na circulação sanguínea (FRIESEN *et al.*, 1987). Uhlig e Seifert (1981), demonstraram uma redução significativa do edema em 50%, doze horas depois da aplicação oral de bromelina, considerando que as administrações só eram efetivas durante as primeiras horas.

Foram comprovados efeitos terapêuticos benéficos em diversos experimentos *in vitro* com o uso da bromelina, que mostrou a diminuição da liberação de mediadores inflamatórios por células imunes (MYNOTT *et al.*, 1999; MYNOTT *et al.*, 2002). Também mostrou efeito positivo em modelos animais de doenças humanas, como pleurisia induzida por carragenina (MAJIMA *et al.*, 1996; OGINO *et al.*, 1996; MAJIMA *et al.*, 1997), aterosclerose em enxerto alogênico em ratos (GACIONG *et al.*, 1996), doenças reumatológicas humanas (MASSON, 1995; WITTERBORG *et al.*, 2000; BROWN, 2000), encefalomielite alérgica experimental, um modelo para esclerose múltipla humana (TARGONI *et al.*, 1999) e rinite alérgica IgE-mediada (THORNHILL E KELLY, 2000).

A bromelina demonstrou eficácia similar a outros medicamentos antiinflamatórios padrões. Uma dose de bromelina de 10 mg/kg i.v. demonstrou atividade antiinflamatória similar a 0,3 mg/kg i.p. de dexametazona (MAJIMA *et al.*, 1996; OGINO *et al.*, 1996; MAJIMA *et al.*, 1997). A bromelina demonstrou eficácia similar ou maior que os antiinflamatórios não hormonais (AINH), em estudos reumatológicos em humanos (MASSON, 1995; WITTERBORG *et al.*, 2000; BROWN, 2000).

Os efeitos terapêuticos benéficos da bromelina vêm sido testados em animais ou humanos com doenças inflamatórias, inclusive artrites e doenças inflamatórias do intestino. Porém, não está claro como cada proteinase dentro do complexo de bromelina contribui em seus efeitos anti-inflamatórios *in vivo* (HALE *et al.*, 2005).

2.2.11. Aplicações Cardiovasculares e Circulatórias.

Pesquisas indicaram que bromelina previne agregação plaquetária, previne ou minimiza ataques de angina, é útil na prevenção e tratamento de trombose e tromboflebite, pode quebrar placas de colesterol, e mostra uma potente atividade fibrinolítica. Se administrada por períodos prolongados de tempo, bromelina também mostrou um efeito de anti-hipertensivo em animais experimentais (GIACCA, *et al.*, 1965; TAUSSIG & NIEPER *et al.*, 1979)

Administração de 400-1000 mg/dia de bromelina para 14 pacientes com angina, resultou no desaparecimento dos sintomas em todos os pacientes dentro de 4 a 90 dias. Resultados semelhantes foram observados em pacientes que tomaram entre 500-700 mg/dia de bromelina. Com a interrupção do tratamento, os ataques de angina reapareceram novamente, disparado repetidamente através de experiências estressantes (NIEPER, 1978; TAUSSIG & NIEPER, 1979).

Uma redução drástica na incidência de infarto coronário depois de administração de potássio e magnésio juntamente com 120 - 400 mg de bromelina por dia também foi informada (NIEPER, 1977). Em um estudo envolvendo 73 pacientes com tromboflebite aguda, bromelina em adição a analgésicos, mostrou reduzir todos os sintomas de inflamação (SELIGMAN, 1969).

Taussig e Nieper *et al.*, 1979 demonstraram que a bromelina foi capaz de dissolver placas ateroscleróticas em aorta de coelhos *in vivo* e *in vitro*. É possível que a bromelina também aumente a permeabilidade do vaso para oxigênio e outros nutrientes, aumentando assim a fluidez do sangue.

2.2.12. Atividade Mucolítica.

O muco produzido nas vias aéreas é uma mistura heterogênea, contém proporções variáveis de água, sais minerais, glicoproteínas do muco, lipídeos e materiais oriundos de células de descamação e bactérias, como proteínas de membrana celular (principalmente a f-actina), lipídeos, DNA e RNA, entre outros. A bromelina demonstrou capacidade de diminuir a

viscosidade de secreções mucosas respiratórias, tanto através de sua atividade proteolítica, quanto através de sua atividade tiol-redutase, promovendo a quebra das pontes dissulfeto inter e intracadeias de mucina, diminuindo as ligações responsáveis pela formação da malha de mucina, atividade similar à N-acetilcisteína (KING E RUBIN, 2002).

Em um estudo clínico, bromelina foi administrada oralmente a 124 pacientes hospitalizados com bronquites crônicas, pneumonia, broncopneumonia e abscessos pulmonares. O resultado foi uma diminuição no volume, na viscosidade e purulência muco respiratório (SCHAFER & ADEMAN 1985). Bromelina também mostrou reduzir a consistência do o muco em coelhos, em experimentos *in vitro* e *in vivo*. (SUZUKI *et al.*, 1983). Alguns experimentos mostraram, *in vitro*, a ação fluidificante e mucolítica da bromelina sobre secreções brônquicas (VENTURA, 2000). Bromelina também pode ser usada no tratamento da asma já que atua na diminuição das doenças alérgicas respiratórias (SECOR JR *et al.*, 2005)

2.2.13. Toxicidade, Efeitos Colaterais e Reações Alérgicas da Bromelina

Bromelina é considerada ter muito baixa toxicidade. Testes de toxicidades em cães, com níveis crescentes de bromelina até 750 mg/kg administrados diariamente, não mostrou nenhum efeito tóxico depois de seis meses. Dosagens de 1,5 g/kg/dia administrada para ratos, não mostrou nenhum efeito carcinogênico ou teratogênico (TAUSSIG *et al.*, 1975).

Bromelina em uma concentração de 500 mg/kg/dia foi administradas oralmente a ratos, e não provocou nenhuma alteração no crescimento, na histologia do coração, rim e baço ou nos parâmetros hematológicos (MOSS *et al.*, 1963).

Estudos pré-clínicos demonstraram a segurança da administração oral de bromelina, mesmo em doses altas como 12 g/dia em humanos (CASTELI *et al.*, 1997). A DL₅₀ da bromelina foi determinada em roedores, correspondendo a 37 e 85 g/kg para via intraperitoneal e 30 e 20 g/kg para via intravenosa, para camundongos e ratos, respectivamente. Doses elevadas como 10g/kg não foram suficientes para alcançar a DL₅₀ por via oral, em roedores (MOSS *et al.*, 1963).

Em 12 estudos foram observados mínimos efeitos colaterais; um estudo anotou uma incidência de 1,8% de diarreia, náusea, desordens gástricas ocasionais e reações alérgicas. Uma companhia registrou apenas oito casos de efeitos colaterais como exantema e urticária depois de mais de 3,5 milhões de tabletes de bromelina vendido a mais de 7 anos (MAURER, 2001). É considerado que bromelina é não tóxica e sem efeitos colaterais; então pode ser usado sem

preocupação em doses de diário de 200 até 2000 mg para períodos prolongados de tempo (KELLY, 1996). Bromelina mostrou benefício terapêutico em doses tão pequenas quanto 160 mg/dia, mas os melhores resultados aconteceram ao começar com uma dose de 750 mg/dia. Geralmente é recomendado que bromelina seja administrada 1 h pelo menos antes das refeições. Os tabletes devem ser revestidos de tal modo que eles resistam a digestão no estômago

Em testes clínicos humanos, não foram observados efeitos colaterais. Suplementação de até 460 mg não teve nenhum efeito na taxa cardíaca ou pressão sanguínea; no entanto, doses crescentes até 1840 mg mostraram aumentos proporcionais na taxa cardíaca. Em alguns casos o aumento pode ser resultado da influência da bromelina na interleucina-1 (IL-1) e produção de Fator de Necrose Tumoral (TNF). Os efeitos máximos foram vistos em 2 horas, mas alguns efeitos residuais permaneceram até 24 horas. Em doses acima de 700 mg palpitações e desconfortos subjetivos foram informados. Mudanças na pressão arterial não foram demonstradas em humanos a qualquer nível de dosagem (GUTFREUND *et al.*, 1978).

Bromelina mostrou reação cruzada em 28% das pessoas com IgE que possui resposta alérgica para veneno de abelhas melíferas (CHIDA, 1986). Combinada com ascorbato oxidase é reconhecida pela IgE de pacientes que são hipersensíveis para pólen de oliveira (BATANERO *et al.*, 1996). Devido ao seu uso para amaciar a carne e clarificar a cerveja, pode ser considerada um agente alergênico, e pode representar uma causa não reconhecida de reação alérgica após uma refeição. Como com outras substâncias alimentares, uma pequena parte, da população, particularmente esses com uma sensibilidade para abacaxi, pode ser sensível a suplementação oral de bromelina (GAILHOFER *et al.*, 1988).

2.2.14. Aplicação na Indústria de Alimentos e Outras Indicações

Dentre as aplicações de bromelina na área industrial, citam-se: o amaciamento de carnes vermelhas (WITAKER, 1976; PINTAURO, 1979); o amaciamento de farinhas de alto teor protéico (DIAZ, 1988; SCHMITT, 1994; GAMS, 1976; COLE, 1973); a fabricação de queijos; o preparo de alimentos infantis e dietéticos; o pré-tratamento da soja; o tratamento do couro, da lã e da seda; o preparo de colágeno hidrolisado (CESAR *et al.*, 1994); a clarificação da cerveja (HEINICKE e GORTNER, 1957; WITAKER, 1976); uso em preparações cosméticas, como pós faciais, cremes e soluções para limpeza de lentes de contato; utilização na indústria de óleos

vegetais, de ovos desidratados, na preparação de leite de soja e hidrolisados protéicos (SILVA, 1991).

2.2.15. Por que as Bromeliáceas Produzem a Bromelina

A importância da bromelina proteinase para as plantas permaneceu um mistério durante um longo tempo. A hipótese é baseada no fato reconhecido que plantas carnívoras retiram seu suprimento de nitrogênio e fósforo da degradação de materiais orgânicos (folhagem, insetos, microorganismos) por meio de proteinases altamente ativas e outras enzimas digestivas. Na floresta tropical as *Bromeliaceae* são epífitas, que crescem sobre outras plantas, que raramente oferecem algum nutriente. O arranjo em forma de roseta das bromeliáceas forma reservatórios que são preenchidos por água, como também por nitrogênio e suprimentos de fósforo. Esta hipótese é apoiada, uma vez que estas plantas reagem a estímulos mecânicos de apenas 2 segundos para produzir proteinases. Além do mais a planta de jarro carnívora *Cerattia purpurea* demonstrou responder a vários sinais químicos (ácidos nucleicos, proteínas e amônia) por secretar enzimas hidrolíticas. Para digerir o máximo possível das proteínas de insetos e microorganismos, esta família desenvolveu ao longo da evolução, este mecanismo de enzimas proteolíticas (Bromelina) com um amplo espectro de pH ótimo (GALLIE e CHANG, 1997).

3. OBJETIVOS



3.1. Objetivo geral

Estudar as características físico-químicas e purificação da bromelina do abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill).

3.2. Objetivos específicos

- Estudar a atividade e extração da bromelina extraída do abacaxi.
- Investigar as propriedades físico-químicas: temperatura e pH ótimos, estabilidade térmica e ao pH da bromelina extraída do abacaxi.
- Determinar os parâmetros cinéticos, K_m e V_{max} da bromelina extraída do abacaxi, utilizando azocaseína e azoalbumina como substratos.
- Purificar a bromelina presente no abacaxi através de cromatografia líquida em FPLC.
- Estimar o peso molecular da bromelina através de eletroforese SDS-PAGE, e determinar a atividade proteolítica usando zimogramas.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHLE, N. W.; HAMLET, M. P. Enzymatic frosbite eschar debridment by bromelain. **Annals of Emergency Medicine**. v. 16, p. 1063-1065, 1987.

AKO, H.; CHEUNG, A. H. S.; MATSUURA, P. K. Isolation of a fibrinolysis enzyme activator from commercial bromelain. **Archives of International Pharmacodynamics**. v. 254, p. 157-167, 1981.

BABU, B., RASTOGI, R. N. K., RAGHAVARAO, K. S. M. Liquid-liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. **Chemical Engineering and Processing**. v.47, p. 83-89, 2008.

BALAKRISHNAN, V.; HAREENDRAN, A.; SUKUMARAN, N. C. Double-blind cross-over trial of an enzyme preparation in pancreatic steatorrhea. **Asso Phys Ind**, v. 29, p. 207-209, 1981.

BARTOLOMÉ, A. P.; RUPÉREZ, P.; FÚSTER, C. Pineapple fruit: morphological characteristics, chemical composition and sensory analysis of red Spanish and Smooth cayenne cultivars. **Food Chemistry**, v. 53, p. 75-79, 1995.

BATANERO, E.; VILLALBA, M.; MONSALVE, R. I. Cross-reactivity between the major allergen from olive pollen and unrelated glycoproteins: evidence of an epitope in the glycan moiety of the allergen. **Journal Allergy Clin Immunol**, v. 97, p. 1264-1271, 1996.

BATKIN, S.; TAUSSIG, S. J.; SZEKERES, J. Antimetastatic effect of bromelain with or without its proteolytic and anticoagulant activity. **Journal of Cancer Research on Clinical Oncology**. v. 114, p. 507-508, 1988.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Introdução à química de alimentos**. 2.ed. São Paulo: Varela,. p. 223. 1992.

BROWN A. C. Lupus erythematosus and nutrition: a review of the literature. **Journal of Renal Nutrition**, v. 10, p. 170–83, 2000.

CASTELL, J.V.; FRIEDRICH, G.; KUHN, C.S.; POPPE, G.E. Intestinal absorption of undegraded proteins in men: presence of bromelain in plasma after oral intake. **American Journal of Physiology**, v. 273, p. G139-46, 1997.

CANECCHIO FILHO, V. **Indústrias rurais**. 2.ed. São Paulo: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, v.12. 1973.

CESAR, A. C.; SILVA, R.; LUCARINI, A. C. **Recuperação das enzimas proteolíticas na casca e talo do abacaxi**. Faculdade de Engenharia Industrial, São Bernardo do Campo- SP, 1994.

CHANDLER, D. S.; MYNOTT, T. L. Bromelain protects piglets from diarrhoea caused by oral challenge with k88+ positive enterogenic Escherichia coli. **Gut**, v. 43, p. 196-202, 1998.

CHIDA, T. A study on dose-response relationship of occupational allergy in a pharmaceutical plant. **Sangyo Igaku**, v. 28, p. 77-86, 1986.

COLE, M. S. An overview of modern dough conditioners. **Bak Dig**, v. 4, p. 21-23, 1973.

COOREMAN, W. Bromelain. In: Pharmaceutical Enzymes- Properties and Assay Methods. **Story-Scientia**, v.8, p.107-121, 1978.

DE-GIULI, M.; PIROTTA, F. Bromelain: interaction with some protease inhibitors and rabbit specific antiserum. **Drugs Exp Clin Res**, v. 4, p. 21-23, 1978.

DESSER, L.; REHBERGER, A. Induction of tumor necrosis factor in human peripheral blood mononuclear cells by proteolytic enzymes. **Oncology**, v. 47, p. 475-477, 1990.

DESSER, L.; REHBERGER, A.; PAUKOVISTIS, W. Proteolytic enzymes and amylase in human peripheral blood mononuclear cells in vitro. **Cancer Biotherapy**, v. 9, p. 253-263, 1994.

DIAZ, N. A. M. **Enzimas em panificação**. In: Vitti, P. Seminário sobre uso de enzimas em biscoitos e panificação, Campinas, ITAL, 19-26, 1988.

FELTON, G. Does Kinin released by pineapple stem bromelain stimulate production of prostaglandin E1-like compound. **Haw Med**, v. 2, p. 39-47, 1976.

FELTON, G. E. Fibrinolytic and antithrombotic action of bromelain may eliminate thrombosis in heart patients. **Med Hypotheses**, v. 6, p.1123-1133, 1980.

FILIPOVA, Y.; LYSOGORSKAYA, E. N.; OKSENOIT, E. S.; RUDENSKAYA, G. N.; STEPANOV, V. M. L-Pyroglutamyl-L-phenylalanyl-LTable leucine-p-nitroanilide – a chromogenic substrate for thiol proteinase assay. **Anal. Biochem**, v. 143, p. 293-297, 1984.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9.ed. São Paulo: Atheneu., p. 230, 2001

FRANCO, G.; CHALOUB, S. R. **Dietas e receitas: valores calóricos e propriedades gerais dos alimentos**. 3.ed. São Paulo: Atheneu., p. 395. 1992.

FRIESEN, A.; SCHILLING, A.; GOFSTETTER, A.; ADAM, D. Tetracyclin-konzentration im Prostata-Sekret. **Z. Antimikrobian Antineoplastik Chirurgie**, v. 2, p. 61-65, 1987.

GACIONG Z, PACZEK L, BOJAKOWSKI K, SOCHA K, WISNIEWSKI M, HEIDLAND A. Beneficial effect of proteases on allograft arteriosclerosis in a rat aortic model. **Ephrology Dial Transplant**, v. 11, p. 987– 989, 1996.

GAILHOFER, G.; WILDERS-TRUSCHNIG, M.; SMOLLE, J.; LUDVAN, M. Asthma caused by bromelain: an occupational allergy. **Clin Allergy**, v. 18, p. 445-450, 1988.

GALLIE, D. R., CHANG S. C. Signal transduction in the carnivorous plant *Sarracenia purpurea*. **Plant Physiol**, v. 115, p. 1461-1471, 1997.

GAMS, T. C. Der Einsatz von mikrobiellen Enzyme in der backerei, getreid, Mehl and Brot. **Bochum**, v. 30, p. 113-116, 1976.

GARBIN, F.; HARRACH, T.; ECKERT, K.; MAURER, H. R. Bromelain proteinase augments human lymphocyte-mediated growth inhibition of various tumor cells in vitro. **International Journal of Oncology**, v. 5, p. 197-203, 1994.

GIACOMELLI, E. J.; PY, C. **Abacaxi no Brasil**. Campinas: Fundação Cargill,. 101 p., 1981.

GERARD, G. Therapeutic anti-cancereuse et bromelaine. **Agressologie**, v. 13, p. 261-274, 1972.

GIACCA, S. Clinical experiments with bromelain in peripheral venous diseases and chronic bronchitic states. **Minerva Med**, v. 56, p. 104, 1965.

GRABOVAC, V.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. 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.; ECKERT, K.; FICHTNER, I. ; SCHULZE-FORSTER, K.; MAURER, H. R. Bromelain proteases suppress growth, invasion and lung metastasis of mouse melanoma cells. **International Journal of Oncology**, v. 11, p. 243-248, 1997.

GUPTA, P.; KHAN R. H.; SALEEMUDDIN, M. Trifluoroethanol-induced “molten globule” state in stem bromelain. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 413, p. 2-15, 2003.

GUPTA, P., MAQBOOL, T. M. Saleemuddin. Oriented immobilization of stem bromelain via the lone histidine on a metal affinity support. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 45, p. 78–83, 2007.

GUTFREUND, A.; TAUSSIG, S.; MORRIS, A. Effect of oral bromelain on blood pressure and heart rate of hypertensive patients. **Haw Med Journal**, v. 34, p. 143-146, 1978.

HALE, L. P.; HAYNES, B. F. Bromelain treatment of human T cells removes CD44, CD45RA, E2/MIC2, CD6, CD7, CD8 and Leu8/LAM1 surface molecules and markedly enhances CD2-mediated T cell activation. **J. Immunol**, v. 149, p. 3809-3816, 1992.

HALE, L. P.; GRRER, P. K. E.; SEMPOWSKI, G. D. Bromelain Treatment Alters Leukocyte Expression of Cell Surface Molecules Involved in Cellular Adhesion and Activation. **Clinical Immunology**, v. 104, p. 183-190, 2002.

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

HALE, P. L.; GREER, P. K.; TRINH, C. T.; JAMES, C. L. Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations. **International Immunopharmacology**, v. 5, p. 783–793, 2005.

HALE, L. P.; GREER, P. K.; TRINH, C. T.; GOTTFRIED M. R. Treatment with oral bromelain decreases colonic inflammation in the IL-10-deficient murine model of inflammatory bowel disease. **Clinical Immunology**. v. 116, p. 135-142, 2005

HALE, L. P., FITZHUGH, D. J., STAATS, HERMAN, F. Oral immunogenicity of the plant proteinase bromelain. **International Immunopharmacology**. v. 6, p. 2038-2046, 2006.

HAQ, S. K.; RASHEEDI, S.; SHARMA, P.; AHMAD, B.; KHAN, R. H. Influence of salts and alcohols on the conformation of partially folded intermediate of stem bromelain at low pH. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 37, p. 361, 2005.

HARRACH, T.; ECKERT, K.; SCHULZE-FORSTER, K.; NUCK, R.; GRUNOW, D.; MAURER, H. R. Isolation and partial characterization of basic proteinases from stem bromelain. *Journal Protein Chemistry*. v.14, p. 41-52, 1995.

HARRACH, T.; ECKERT, K.; MAURER, H. R. Isolation and Characterization of Two Forms of an Acidic Bromelain Stem Proteinase. **Journal of Protein Chemistry**, v. 17, p. 350-361, 1998.

HATANO, K.; KOJIMA, M.; TANOKURA, M.; TAKAHASHI, K. Solution structure of bromelain inhibitor VI from pineapple stem: structural similarity with Bowman-Birk trypsin/chymotrypsin inhibitor from soybean. **Biochemistry**, v. 35, p. 5379-53-84, 1996.

HEBBAR U. H., SUMANA B., RAGHAVARAO K. S. M. S. Use of reverse micellar systems for the extraction and purification of bromelain from pineapple wates. **BioresourceTechnology**. doi:10.1016/j.biortech.2007.09.038, 2007.

HEINICKE, R. M.; GORTNER, W. A. Stean bromelain: A new protease preparation from pineapple plants. **Economic Botany**, 11, 225, 1957.

HEINECKE, R. M.; WAL, L.; YOKOYAMA, M. Effect of bromelain on human platelet aggregation. **Experimentia**, v. 28, p. 844-845, 1972.

HOUCK, I. C.; CHANG, C. M.; KLEIN, G. Isolation of an effective debriding agent from the stems of pineapple plants. **International Journal of Tissue Reactions**, v. 5, p. 125-134, 1983.

INOUE, K.; MOTONAGA, A.; DAINAKA, J. Effect of etodolac on prostaglandin E₂ biosynthesis, active oxygen generation and bradykinin formation. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 51, p. 457-462, 1994.

KALRA, N.; BHUI, K.; ROY, P.; SRIVASTAVA, S.; GEORGE J.; PRASAD, S.; SHUKLA, Y. Regulation of p53, nuclear factor κ B and cyclooxygenase-2 expression by bromelain through targeting mitogen-activated protein kinase pathway in mouse skin. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 226, p. 30-37, 2008

KANE, S.; GOLDBERG, M. J. Use of Bromelain for Mild Ulcerative Colitis. **Annals of Internal Medicine**, v. 132, p. 680, 2000.

KELLY, G. S. Bromelain: a literature review and discussion of its therapeutic application. **Alt. Med. Ver**, v. 1, p. 243–257, 1996.

KLAUE, P.; DILBERT, G.; HINKLE, G. Tieexperimentelle Untersuchungen zur enzymatischen Lokalbehandlung subdermaler Verbrennungen mit Bromelain. **Therapiewoche**, v. 29, p. 796-799, 1979.

KING, M. & RUBIN, B. K. Pharmacological approaches to discovery and development of new mucolytic agents. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 1475-1490, 2002.

KNILL-JONES, R. P. P.; EARCE, H.; BATTEN, J. Comparative trial of Nutrizym in chronic pancreatic insufficiency. **Brit Med**, v. 4, p. 21, 1970.

HUNG, T.; CHAN, Y.; SUNG, H.; CHANG, T. Purification and characterization of hydrolase with chitinase and chitosanase activity from commercial stem bromelain. **Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4666-4673, 2002.

KOLAC, C.; STREICHMAN, P.; LEHR, C. M. Oral bioavailability of proteolytic enzymes. **European Journal of Pharmacology**, v. 42, p. 222-232, 1996.

LEE, K. L.; ALBEE, K. L.; BERNASCONI, R. J. Complete amino acid sequence of ananain a comparison with bromelain and other plant cysteine protease. *Biochemistry Journal*, v. 327, p. 199-202, 1997

LENARCIC, B.; RITONJA, A.; TURK, B.; DOLENC, I.; TURK, V. Characterization and structure of pineapple stem inhibitor of cysteine proteinases. **Biol. Chem**, v. 373, p. 459-464, 1992.

LIVIO, M.; BERTONI, M. P.; DE GAETANO, G. Effect of bromelain on fibrinogen level, prothrombin complex factors and platelet aggregation in the rat - A preliminary report. **Drugs Expt Clin Res**, v. 4, p. 49-53, 1978.

LUERTI, M.; VIGNALI, M.L. Influence of bromelain on penetration of antibiotics in uterus, salpinx and ovary, **Drugs Expt Clin Res**, v. 4, p. 45-48, 1978.

MAJIMA M, KAWASHIMA N, HIROSHI I, KATORI M. Effects of an orally active non-peptide bradykinin B2 receptor antagonist, FR173657, on plasma exudation in rat carrageenin-induced pleurisy. **British Journal of Pharmacology**, v. 121, p. 723–730, 1997.

MAJIMA, M.; NISHIYAMA, K.; IGUCHI, Y.; YAO, K.; OGINO, M.; OHNO, T. Determination of bradykinin-(1– 5) in inflammatory exudate by a new ELISA as a reliable indicator of bradykinin generation. **Inflammatory Research**, v. 45, p. 416– 423, 1996.

MASSON, M. Bromelain in blunt injuries of the locomotor system. A study of observed applications in general practice. **Fortschrer Medicine**, v. 113, p. 303– 306, 1995.

MAURER, A.; DONATH, F.; MAI, I.; ROOTS, I. On the bioavailability of bromelain containing in two different formulas after multiple oral dosage. **European Journal of Clinical Pharmacology**. v. 50, p. 548, 1996.

MAURER, H. R.; ECKERT, K. Bromelain in der komplementären Tumorthherapie Z. **Onkol./J. of Oncol.** v. 31, p. 66-73, 1999.

MAURER, H.R. Bromelain: Biochemistry, Pharmacology and Medical Use. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, p. 1234-1245, 2001.

METZIG, C. ; GRABOUSKA, E. ; ECKERT, K.; REHSE, K.; MAURER, H. R. Bromelain proteases resuce human platelet aggregation in vitro and in vivo. **In vivo**, v. 13, p. 7-12, 1999.

MORITA, A. H.; UCHIDA, D.A.; TAUSSIG, S. J. Chromato graphic fractionation and characterization of the active platelet aggregation inhibitory factor from bromelain. **Arch Inter Phar Ther**, v. 239, p. 340-350, 1979.

MOSS, I. N.; FRAZIER, C. V.; MARTIN, G.J. Bromelains, the pharmacology of the enzymes. **Archives of International Pharmacodynamics**, v. 145, p. 166-189, 1963.

MUNZIG, E.; ECKERT, K.; HARRACH, T. Bromelain protease F₉ reduces the CD₄₄ mediated adhesion of human peripheral blood lymphocytes to human umbilical vein endothelial cells. **FEBS Lett**, v. 351, p. 215-218, 1995.

MYNOTT, T. L.; LUKE, R. K.; CHANDLER, D. S. Oral administration of protease inhibits enterotoxigenic Escherichia coli receptor activity in piglet small intestine. **Gut**, v. 38, p. 28-32, 1996.

MYNOTT, T. L.; GUANDALINI, S.; RAIMONDI, F. Bromelain inhibits intestinal secretion caused by vibrio cholerae and Escherichia coli enterotoxins in rabbits intestine in vitro. **Gastroenterology**, v. 113, p. 175-184, 1997.

MYNOTT, T. L.; LADHAMS, A.; SCARMATO, P.; ENGWERDA, C. R. Bromelain, from pineapple stems, proteolytically blocks activation of extracellular regulated kinase-2 in T cells. **Journal of Immunology**, v. 163, p. 2568– 2575, 1999.

MYNOTT, T. L.; CROSSETT, B.; PRATHALINGAM, S. R. Proteolytic inhibition of Salmonella enterica serovar typhimurium-induced activation of the mitogen-activated protein kinases ERK and JNK in cultured human intestinal cells. **Infection Immunology**, v. 70, p. 86– 95, 2002.

NAPPER, A. D.; BENETH, S.; BOROWSKY, P. Purification and characterization of multiple forms of the pineapple stem derived cysteine proteinases ananain and comosain. **Biochemistry Journal**, v. 301, p. 727-735, 1994.

NETTI, C.; BANDI, G. L. ; PECILE, A. Antiinflammatory action os proteolytic enzymes administered orally compared with antiphogistic compounds. **Ilustrated Pharmacology**, v. 8, p. 453-466, 1972.

NIEPER, H. A. Bromelain in der Kontrolle malignen Wachstums. **Krebgeschehen**, v. 1, p. 9-15, 1976.

NIEPER, H. A. A program for the treatment of cancer. **Krebs**, v. 6, p. 124-127, 1974.

NIEPER, H. A. Decrease of the incidence of coronary heart infarct by Mg- and K-orotate and bromelain. **Acta Med Empirica**, v. 12, p. 614-618, 1977.

OGINO, M.; MAJIMA, M.; KAWAMURA, M.; HATANAKA, K.; SAITO, M.; HARADA, Y. Increased migration of neutrophils to granulocyte-colony stimulating factor in rat arrageenin-induced pleurisy: roles of complement, bradykinin, and inducible cyclooxygenase-2. **Inflammation Research**, v. 45, p. 335-46, 1996.

PAULA, C. C.; SILVA, H. M. P. **Cultivo Prático de Bromélias**. Viçosa: UFV, 2004.116 p.

PINTAURO, N. D. Meat and fish products. **Food Processing Enzymes**, p. 231-262, 1979.

POSCHET, J. F.; ZOUABI, K.; FAIRCLOUGH, P. D. Effect of Bromelain on Salmonella typhimurium invasion in cultured human macrophage-like cells. **Gut**, v. 44, Suplemento 1, Resumo 64A, 1999.

RABELO, A. P. B.; TAMBOURGI, E. B.; PESSOA, A. Bromelain partitioning in two-phase aqueous systems containing PEO–PPO–PEO block copolymers. **Journal of Chromatography B**. v. 807, p. 61-68, 2004.

RALF, B. M. D., DANIEL, P. M. D., EVGENI M. M. D., UDO S. M. D., RICARDA D. D. Bromelain Ameliorates Hepatic Microcirculation After Warm Ischemia. **Journal of Surgical Research**. v. 139, p. 88–96, 2007.

RENZINI, G.; VARENGO, M. Die Resorption von Tetrazyklin in Gegenwart von Bromelain bei oraler Applikation. **Arzneimittel-Forscher**, v. 2, p. 410-412, 1972.

ROWAN, A. D.; BUTTLE D. J.; BARRET, A. J. The cysteine proteinases of the pineapple plant. **Biochemical Journal**, v.266, n.3, p.869-75, 1990.

RYAN, R. E. A double-blind clinical evaluation of bromelains in the treatment of acute sinusitis. **Headache**, v. 7, p. 13-17, 1967.

SAN-LANG, W., HUE-TIN, L., TZU-WEN, L., YU-JEN, C., YUE-HORNG, Y., SHIAN-PIN G. Reclamation of chitinous materials by bromelain for the preparation of antitumor and antifungal materials. **Bioresource Technology**. doi:10.1016/j.biortech.2007.08. 035, 2007.

SCHAFER, A.; ADELMAN, B. Plasmin inhibition of platelet function and of arachidonic acid metabolism. **Journal Clin Invest**, v. 75, p. 456-461, 1985.

SCHMITT, M. Ingredients. **Food Marketing and Technology**, v. 8, p. 14-16, 1994.

SECOR JR, E. R.; CARSON F. I. V.; CLOUTIER, M. M.; GUERNSEY L. A.; SCHRAMM C. M.; ROGE C. A. Bromelain exerts anti-inflammatory effects in an ovoalbumin-induced murine model of allergic airway disease. **Cellular Immunology**. v. 237, p. 68-75, 2005.

SEIFERT, J.; GANSER, R.; BRENDDEL, W. Die Resorption eines proteolytischen Proteins pflanzlichen Ursprungs aus dem Magen-Darm-Trakt in das Blut und in die Lymphe von erwachsenen Ratten. **Z. Gastroenterology**, v. 17, p. 1-8, 1979.

SELIGMAN, B. Oral bromelains as adjuncts in the treatment of acute thrombophlebitis. **Angiology**, v. 20, p. 22-26, 1969.

SHI, W., WEI, M., JIN, L., LI, C. Calcined layered double hydroxides as a “biomolecular vessel” for bromelain: Immobilization, storage and release. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 47, p. 58–65, 2007.

SILVA, L.C. Racine Revista, jul/ago., 6, 1991.

SREENATH, H. K.; SUDARSHANAKISHNA, K.; SANTHANAM, K. Improvement of juice recovery from pineapple pulp/residue using cellulases and pectinases. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 78, n.61, p. 486-488, 1994.

SUZUKI, K.; NIHO, T.; YAMADA, H. et al. Experimental study of the effects of bromelain on the sputum consistency in rabbits. **Nippon Yakurigaku Zasshi**, v. 81, p. 211-216, 1983.

TARGONI, O. S.; TARY-LEHMANN, M.; LEHMANN, P.V. Prevention of murine EAE by oral hydrolytic enzyme treatment. **Journal of Autoimmunology**, v. 12, p. 191–198, 1999.

TANAKA, K.; HILARY, Z. D.; ISHIZAKI, A. Investigation of utility of pineapple juice and pineapple waste material as low-cost substrate for ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87, p. 642-646, 1999.

TASSMAN, G.C.; ZAFRAN, J. N.; ZAYON, G. M. A double-blind crossover study of a plant proteolytic enzyme in oral surgery. **Journal Dent Med**, v. 20, p. 51-54, 1965.

TASSMAN, G. C.; ZAFRAN, J. N.; ZAYON, G. M. Evaluation of a plant proteolytic enzyme for the control of inflammation and pain. **Journal Dent Med**, v. 19, p. 73-77, 1964.

TAUSSIG, S. J.; YOKOYAMA, M. M.; CHINEN, N. Bromelain: A proteolytic enzyme and its clinical application. **HirJ Med Sci**, v. 24, p. 183-183, 1975.

TAUSSIG, S. J.; NIEPER, H. A. Bromelain: its use in prevention and treatment of cardiovascular disease, present status. **Journal IAPM**, v. 6, p. 139-151, 1979.

TAUSSIG, S. J.; SZEKERCZES, J.; BATKIN, S. Inhibition of tumor growth in vitro by bromelain, an extract of the pineapple plant (*Ananas comosus*). **Planta Med**, v. 6, p. 538-539, 1985.

TAUSSIG, S. J. AND 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.

THORNHILL, S. M.; KELLY, A. M. Natural treatment of perennial allergic rhinitis. *Alternative Medicine Reviews*, v. 5, p. 448– 454, 2000.

TINOZZI, S.; VENEGONI, A. Effect of bromelain on serum and tissue levels of amoxacylin. **Drug Experimental Clinical Research**, v. 1, p. 39-44, 1978.

UHLIG, G.; SEIFERT, J. The effect of proteolytic enzymes (traumanase) on posttraumatic edema. **Fortschr Med**, v. 99, p. 554-556, 1981.

VELLINI, M.; DESIDERI, D.; MILANESE, A. Possible involvement of eicosanoids in the pharmacological action of bromelain. **Arzneimittelforschung**, v. 36, p. 110-112, 1986.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Bebidas, tecnologia, química y microbiológica**. Zaragoza: Acribia, 1997. p. 487.

VENTURA, A. P. M.; SILVA, J. A. N.; SANTOS, R. C. E.; ALMEIDA, D. K. A; **Ação proteolítica da bromelina na liquefação da secreção brônquica**. XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Recife, PE, Brasil, FM225, p. 270, 2000.

WHITAKER, J. R. Practical applications of enzyme technology. **Enzymes - Use and Control in Food**, 1976.

WITTENBORG A.; BOCK, P. R.; HANISCH, J.; SALLER, R.; SCHNEIDER, B. Comparative epidemiological study in patients with rheumatic diseases illustrated in a example of a reatment with non-steroidal anti-inflammatory drugs versus an oral enzyme combination preparation. **Arzneimittel-Forschung**, v. 50, p. 728– 738, 2000.

YODOYA, S., TAKAGI, T., KUROTANI M., HAYASHI, T., FURUTA M. Immobilization of bromelain onto porous copoly (c-methyl-L-glutamate/L-leucine) bead. **European Polymer Journal**. v. 39, p. 173–180, 2003.

YONEHARA, N.; SHIBUTANI, T.; INOKI, R. Contribution of substance P to heat-induced edema in rat paw. **Journal Pharmacol Exp Ther**, v. 242, p. 1071-1076, 1987.

**5. ARTIGO A SER SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO
ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY**

Studies of Bromelain, Cysteine Peptidase, from *Ananas comosus* L. Merrill (Pineapple-Bromeliaceae): Purification and Physico-Chemical Characterization

R. Afonso da Silva ^{a,b}, P. G. Cadena ^{a,b}, M. C. B. Pimentel ^{a, b}, J. L. Lima Filho ^{a, b,*}

^a Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil. ^b Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

(*) Corresponding author:

E-mail address: joseluz_60@yahoo.com.br (J. L. Lima Filho).

5.1. Abstract

The crude extract (CE) of pineapple was partially purified by dialyses and 80% (w/v) ammonium sulphate saturation (CED80%) showed 3.39-fold purification with activity recovery of 289% and specific activity of 18.25 U mg⁻¹ protein. Both CE and CED80% enzyme preparations presented optimum pH of 8.5 and 7.2, respectively and optimal temperature of 50°C. The bromelain exhibited thermal stability up to 60°C and was stable at large range of pH (5.0-9.0). Kinetic studies revealed similar activity for azocasein and azoalbumin substrates (K_m of 2.48 and 2.94 mg mL⁻¹, respectively), but different catalytic efficiencies (31.62 min⁻¹ for azocasein and 8.39 min⁻¹ for azoalbumin). The molecular weight of the bromelain CE was estimated by SDS-PAGE, showing four bands: 40 kDa, 29 kDa, 27kDa and one band of low molecular weight smaller than 14kDa. The Zymogram revealed two caseinolytic bands, 29kDa and smaller 14kDa. The Gel-filtration chromatography of CED80% preparation showed active peak (P2), which presented a high specific activity (116 U/mg protein) and purification fold (25.1), with two bands in SDS-PAGE of 29 and 27kDa, respectively. The cation-exchange chromatography of CED80% was unsuccessful in the separation, while the active peak (P2) sample was purified by anion-exchange chromatography producing a single peak (P1), which showed single band in SDS-PAGE of 29kDa. This result proved that the purification steps of fruit bromelain produced a quite homogeneous enzyme preparation.

Key-words: Bromelain; Purification; *Ananas comosus*, Cysteine protease

5.2. Introduction

Pineapple (*Ananas comosus* L. Merrill), native to Central and South America, is widely grown in tropical regions, which varieties are plentiful, but only a few leading types are sold commercially [1]. Bromelain belong to a group of proteolytic enzymes, a complex mixture of cysteine peptidases and other not yet completely characterized components such as phosphatases, glucosidases, peroxidases cellulases, glycoproteins and carbohydrates among others [2]. In addition, bromelain contains several proteinase inhibitors, obtained from the tissues of plant family Bromeliaceae of which pineapple is the best known source [3]. Studies to test the potential efficacy of bromelain in clinical trials in animals or humans have been limited by the lack of assays to control for differences in the composition and proteolytic activity of naturally bromelain preparations. It is usually distinguished as either stem bromelain (E.C.3.4.22.32, formerly E.C.3.4.22.4) is the most abundant proteinase within bromelain preparations derived from pineapple stem, fruit bromelain (the major proteinase present in pineapple fruit; EC3.4.22.33, formerly EC3.4.22.4 and 3.4.22.5) and ananaina (EC3.4.22.31), depending on its source [4]. Bromelain contains several distinct cysteine proteinases that have similar but distinct amino acid sequences, as well as differences in proteolytic specificity and sensitivity to inactivation [5]. Bromelain is prepared from cooled pineapple juice by centrifugation, ultrafiltration and lyophilization. The process yields a yellowish powder, the enzyme activity of which is determined with different substrates such as casein (FIP units), gelatine (gelatine digestion units) or chromogenic tripeptides [1,]. In aqueous solution, bromelain rapidly deteriorates through self-digestion. The addition of serum containing α 2-macroglobulin will prevent self-digestion. Bromelain have been suggested or proven to have antiinflammatory effects in several different animal models of inflammation and human inflammatory diseases. These include carrageenan-

induced pleurisy in the rat, immunologically mediated arteriosclerosis in rat aortic allografts, the experimental allergic encephalomyelitis (EAE) murine model for the human autoimmune disease multiple sclerosis, collagen- or adjuvant-induced arthritis, IgE-mediated perennial allergic rhinitis, and some human rheumatologic diseases, inhibition of platelet aggregation, fibrinolytic activity, skin debridement properties, modulation of cytokines and immunity, treatment of asthma, enhanced absorption of other drugs, particularly of antibiotics, mucolytic properties, digestive assistance [5,6,7,8]. Our studies thus far show that treatment with oral bromelain decreases the development of spontaneous colitis and also decreases the severity of established colitis in the IL-10 knockout model of murine inflammatory bowel disease, reducing edema, thrombophlebitis, sinusitis and as adjuvant in cancer treatment [9]. In addition, bromelain has shown both antiproliferative and antimetastatic effects in tumor models *in vitro* and *in vivo* [10]. Commercial bromelain preparations are evaluated according to their proteolytic activity. When the proteolytic fraction of bromelain is purified and extracted, the result is a potent proteolytic enzyme *in vitro*; however, this component has been shown to be physiologically inactive *in vivo* for many of the conditions where bromelain has a beneficial effect. The platelet aggregation inhibitory and antiinflammatory action seem to be related to the protease activity. However, other effects such as inhibition of tumor cell growth and metastasis as well as debridement of burns are associated with other nonproteolytic components contained in bromelain [8]. It appears that a great deal of the physiological activity of bromelain is not accounted for in its proteolytic fraction and it is likely that the beneficial effects of bromelain are due to multiple factors, not to one single factor that can be isolated. Thus, the determination of the proteolytic activity alone may not be sufficient to completely characterize the pharmacological properties of bromelain. Since bromelain is derived from a natural source, different sources can exhibit variability in their physiological activity, even when their proteolytic activity is the same. Bromelain is not heat

stable so it's physiological activity can be further reduced by improper processing or storage conditions. The purpose of these studies was investigating the physico-chemical properties and the purification of fruit bromelain from *Ananas comosus* L. Merrill by high-resolution fast protein liquid chromatography (FPLC).

5.3. Materials and Methods

5.3.1. Materials

The pineapple fruits (*Ananas comosus* L. Merrill) variety Perola belonging Family *Bromeliaceae* used in the study were obtained from the regional market. All chemicals were of analytical grade.

5.3.2. Bromelain extraction of pineapple

First, the pineapple was washed, peeled and the fruit (pulp) without stem was squeezed under hand pressure to obtain a juice. This juice was filtered to remove plant debris and centrifuged at 7.000 x g for 30 minutes at 4°C. The precipitate was discarded and the supernatant was collected, filtered, dialysed against 30 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 containing 5 mM EDTA and 5 mM cysteine (final concentration) and immediately frozen at (– 20°C) for further experiments.

5.3.3. Concentration of bromelain by ammonium sulphate precipitation

Solid (NH₄)₂SO₄ was added to the crude extract (CE), which was previously dialyzed (CED), to 80% saturation (CED80%). All subsequent steps were carried out at 4°C. The resulting precipitate was separated by centrifugation at 7.000 x g for 30 min at 4 °C, and resuspended in the

small possible volum of buffer (30 mM sodium phosphate of pH 7.0), dialysed and liophilysed, until analysis.

5.3.4. Bromelain Activity Assay

Proteolytic activity was determined using the method described by Leighton et al. [11], which is based on enzymatic hydrolysis of the azocasein substrate (1% w/v) in tris during one hour. The enzymatic mixture reaction consisted of 150 uL of azocasein and 250 uL bromelain solution (CE, CED80%). The unhydrolysed azocasein substrate was precipitated with 1.4 mL of 10% (w/v) trichloroacetic acid (TCA). Each test tube was centrifuged at 4.000 x g for 15 minutes at 4°C. After centrifugation, 0.8 mL the supernatant was collected and added 1.4 mL of 1M sodium hydroxide and the absorbance was measured at 440 nm. One unit of activity was defined as the amount of enzyme that produces an increment of one absorbance unit at 440 nm after one hour at 25 °C and 100 mM Tris-HCl buffer, pH 7.2.

5.3.5. Protein Content Determination

Concentration of the protein was determined by dye binding method [12] using Coomassie Blue G250. The reagent was prepared by dissolving 100 mg of Coomassie Blue G250 in a mixture of 50 mL of 95% (v/v) ethanol and 100 mL of 85% (v/v) phosphoric acid. After complete dissolution of dye, the final volume was made up to 1000 mL using double distilled water. The reaction mixture was performed by 50 uL of sample and 1.5 mL of dye reagent. Optical density was measured at 595 nm. Bovine serum albumin (BSA) was used as a standard.

5.3.7. Effect of pH and temperature on the bromelain activity

The optimal pH of the bromelain was determined by preparing the azocasein substrate using buffers with different pH values. The buffers used were: 100 mM sodium citrate buffer, pH 5.0-5.4; 100 mM sodium phosphate buffer pH 6.0-6.5 and 100 mM Tris-HCl buffer, pH 7.2-9.0.

The optimal temperature of bromelain was determined by the proteolytic activity values at various temperatures intervals (25-90°C), using azocasein as the substrate under standard assay conditions.

5.3.7. pH and thermal stability

The influence of pH on the stability of the bromelain was determined by pre-incubating CED80% in the above mentioned buffer solutions at pH range from 5.0 up to 9.0. At defined time intervals from 0 up to 120 minutes, samples were withdrawn for determining the residual proteolytic activity under standard assay conditions. For thermostability samples of bromelain preparation were incubated at various temperatures (30, 40, 50, 60, 70 and 80°C) for 0, 30, 60, 90 and 120 minutes, cooled 15 minutes at room temperature (25°C) and submitted at residual proteolytic activity assay under standard assay conditions.

5.3.8. Determination of K_m and V_{max}

Michaelis Constant (K_m) and Maximal Velocity (V_{max}) of the bromelain were determined using azocasein or azoalbumin as substrates at different concentrations (0.25-20 mg mL⁻¹) in 100 mM Tris-HCl buffer pH 7.2 and temperature of 50°C. Lineweaver-Burk plots [13] were constructed by plotting the reciprocal of the specific enzyme reaction velocity (1/v) versus the reciprocal of the substrate concentration (1/s). The Michaelis constant (K_m) and maximum reaction velocity

($V_{\max}$) were obtained from the negative reciprocal of the intercept with the $1/s$ axis and the reciprocal of the intercept with the $1/v$ axis, respectively.

5.3.9. Gel-filtration Chromatography

CED80% was fractionated by gel filtration column TSKG4000SW (TOSOH) in ÄKTA-FPLC system, which was previously equilibrated with 30 mM phosphate sodium buffer pH 7.2. Using the same buffer, the elution was carried out at flow rate 0.5 mL min^{-1} and 1.5 mL fractions were collected by absorbances at 280 nm and assayed for proteolytic activity. The major active fractions were collected and stored at -20°C for further analysis. Active protease fractions were combined (10.5 mL) and used to load the ion-exchange column. Applied samples were clarified by filtration (Millex GP 0.22 μm Millipore).

5.3.10. Anion-Exchange Chromatography

The mixture of the active fractions collected from the gel filtration and dialyzed with ultrapure water, were applied to FPLC Mono Q HR 10/10 column (Amersham Biosciences) equilibrated with buffer A (30 mM Tris-HCl pH 7.2). The bound proteins were eluted at flow rate 1.0 mL min^{-1} with linear gradient 0-100% of 1M NaCl in Tris-HCl buffer. Fractions of 1.5 mL were collected by detection of the protein absorption at 280 nm and proteolytic activity assayed. The major active fractions were collected and stored at -20°C for further analysis.

5.3.11. Cation-Exchange Chromatography

CED80% was applied to FPLC Mono S HR 5/5 column (Amersham Biosciences) equilibrated with buffer A (30 mM phosphate sodium pH 7.2) followed by washing with the same buffer.

Bound proteins were eluted at flow rate 1.0 mL min^{-1} with linear gradient 0-100% of 1M NaCl in

fosphate buffer. Fractions of 1.5 mL were collected by detection of the protein absorption at 280 nm and activity proteolytic assayed.

5.3.12. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) was carried out for the determination of purity and molecular weight of the enzyme as described by Laemmli [14], stacking gel was prepared with 4.0% (w/v) polyacrylamide, 0.8% (w/v) N,N'-methylene-bis(acrylamide), and 10% (w/v) SDS and the separating gel (8 cm x 8 cm x 0.75 mm) was prepared with 15% (w/v) polyacrylamide, 0.6% (w/v) N,N'-methylene-bis(acrylamide) and 10% SDS. Samples were prepared by mixing the enzyme lyophilized with distilled water containing 0,5 M Tris–HCl pH 6.8, 10% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 5% (v/v) b-mercaptoethanol and 2% (w/v) bromophenol blue. Samples were heated in water bath at 100°C for 3 minutes before electrophoresis. Then, 10 uL of samples were applied on the gel surface and fractionated for 2h, starting in constant current at 30 mA. Gels were stained with 0.25% Coomassie Brilliant Blue R250 in 25% methanol– 10% acetic acid and destained with 25% methanol–10% acetic acid. The molecular weight of the enzyme was estimated using a low molecular weight calibration kit as markers (Sigma), constituted by: Bovine serum albumin (66,000 Da), egg white ovalbumin (45,000 Da), glyceraldehydes-3-P dehydrogenase (36,000 Da), bovine carbonic anhydrase (29,000 Da), bovine trypsinogen (24,000 Da), trypsin inhibitor (20,100 Da) and α -lactoalbumin (14,200 Da).

4.3.13. Zymogram

The zymogram experiments [15] were performed to detect the proteolytic activity of bromelain in the 15% SDS-PAGE in the above mentioned conditions, non-reducing conditions (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 1% SDS, 0.5% bromophenol blue and 20% glycerol) at 4 °C. After electrophoresis, the gels were incubated in 2.5% (v/v) Triton X-100 in 0.1 M Tris-HCl pH 7.2 for 30 minutes at 4°C with gentle agitation to remove SDS. The gels were washed twice with destiled water and incubated for 30 minutes at 4°C in 3% (w/v) casein substrate in 0.05 M Tris HCl buffer pH 7.2. After 90 minutes at room temperature (25°C) , the zymogram was washed and incubed for 60 minutes in 0.1 M Tris-HCl pH 7.2, followed by the staining of the gels using 0.1% comassie brilliant blue R-250 solution in methanol-glacial acetic acid-water (5:2:5, v/v/v). Destaining of the zymogram was carried out using aqueous solution of 30% methanol and 10% acetic acid. Unstained bands evidenced proteolytic activity.

5.4. Results and Discussion

5.4.1. Extraction and concentration of pineapple bromelain by ammonium sulphate precipitation

The pineapple crude extract diretly concentrated with 80% (w/v) ammonium sulphate (CE80%) presented purification factor of 2.45 fold and activity recovery of 173.5% containing specific activity of 5.16 U mg protein⁻¹, recovering about 70% of the initial total proteins .The effect of the dialysis of crude extract before the addition of 80% (w/v) ammonium sulphate for removing sugar from pineapple crude extract which is rich in carbohydrates thereby interfering in proteolytic activity of bromelain. The purification factor of the CED in relation to the CE

increased about 3 times with activity recovery of 289% and specific activity of 18.25 U mg protein⁻¹. Other authors have been reported that dialysis of the acidic protease crude extracts increased the purification fold from 2.08 to 4.6 or from 4.16 to 4.33 and the specific activity from 0.25 to 0.26 U mg protein⁻¹ [16]. The CED preparation was concentrated with 80% (w/v) of ammonium sulphate (CED80%) increasing the factor of purification for 3.39 times with activity recovery and total protein of 260% and 64.9% respectively. This really shows the positive effect of the provided dialysis CE. The CED80% was used for measurement of optimal temperature and pH, also it was used as the first stage of purification, followed by the chromatographic methods.

5.4.2. Effect of pH and temperature on the bromelain activity

The effect of pH on bromelain activity was studied by using azocasein as substrate at various pH values. The pH-activity profile for the CE and CED80% is showed in Fig. 1. The CE and CED80% showed maximum activity in pH values 8.5 and 7.2 respectively, however the bromelain has been showed activity in all pH range studied (5.0-9.0). Similar results were reported by other authors [17] in which the optimal pH for fruit bromelain of pineapple was in the range from 8.0 to 8.3. The partially purified fraction showed optimum pH between 7.0-7.5 [18] similar the fraction (CED80%). The enzymatic activities comprise a wide spectrum with optimal pH between 4.5-9.8 [19]. Fig. 2 illustrates the influence of different temperatures on the bromelain activity. The relative activity of CE and CED80% increased with increasing of the temperature from 25 to 50°C followed of sharp decreasing of activity at higher temperatures due to thermal denaturation of the protein, being completely denaturated at 90°C. The optimal temperature (50°C) is in agreement with that reported [20], where the optimum temperature for the activity of bromelain was found to be at about 55°C. The residual activity at 80°C for CE and

CED80% were about 47.7 and 24.87%, respectively. This result shows that the sugar contained in the crude extract protects the protein structure of bromelain from thermal denaturation.

5.4.3. pH and thermal stability

For investigation of the pH stability, the CE was incubated in buffers with different pH values for 120 minutes at 25°C and residual activities were determined at pH 8.5. The enzyme was unaffected by incubations during 120 min at different pH values. Bromelain was very stable in broad pH range (5-9) Fig. 3, maintaining over 90% of its original activity in all tested pH. Was observed the maximum retention of activity (109%) in pH 7.2 after 90 minutes of incubation. Murachi and Yamazaki [21] reported no changes in conformation of bromelain up to pH 10. Generally, these data are in agreement with that reported by Lima and Romanelli [22] where bromelain showed stability in a pH range between 3.0 and 8.0. The thermal stability profile of the CE showed that this enzyme is highly stable at temperatures below 60°C but was desnaturated at higher temperatures (Fig. 4). The enzyme at 60°C remains fully active even after 120 min of incubation retaining about 80% of the original activity during the same period of incubation, indicating that this protease might be used under mild heating conditions. The results clearly indicated the sharp decline in enzyme stability at temperature above 70°C. The bromelain retained more than 100% of its initial activity after 2 hours of incubation at 50°C, while 8.27% and 1.76% of the maximal activity remained after 30 min of incubation at 70 and 80°C, respectively. It has been reported that the bromelain retained 81% of its initial activity after heat treatment at 50°C [7]. Bromelain was stable at temperatures between 40 and 55 °C [21]. The reactive site of bromelain contains one free sulfhydryl group and two disulfide bonds in the molecular structure [23], which are essential for the enzyme activity. Then, any changes in these

groups will lead to loss of the activity. The fact that sulfhydryl group can be easily oxidized may account for the fact that bromelain is easily denatured at elevated temperatures [20].

5.4.4. Determination of K_m and V_{max}

The Lineweaver-Burk plots for bromelain were linear following the Michaelis-Menten model for the range of substrate concentrations tested. The correlation coefficients for the linear regressions were 0.99789 and 0.99345 for azocasein and azoalbumin substrate, respectively. The apparent K_m values were almost similar using azocasein or azoalbumin substrate, 2.48 U mL^{-1} and 2.94 U mL^{-1} respectively, showing that the bromelain had similar affinity for both substrates. On the other hand apparent V_{max} value for azocasein substrate was three times higher than one for azoalbumin (35.29 and 11.11 U mL^{-1} respectively). The values of K_{cat} were calculated to show the turnover number of bromelain for azocasein ($78.42 \text{ U mg protein}^{-1}$) which was 3.17 times higher than one for azoalbumin ($24.68 \text{ U mg protein}^{-1}$). This effect can be explained due to diffusion limitation of the product from the bromelain catalytic site because the size of these proteins (azocasein = 21 kDa and azoalbumin = 45 kDa). Then the catalysis efficiency using azocasein (31.62 min^{-1}) was 3.77 higher than one for azoalbumin (8.39 min^{-1}) which is a protein about twice bigger than azocasein, also causing a decrease in the diffusion-controlled rate of combination of enzyme and substrate to form enzyme-substrate complex.

5.4.5. Gel-filtration Chromatography

The CED80% was applied to gel-filtration chromatography. The elution profile is shown in the Fig. 5. It was obtained two peaks P1 and P2, which the last one presented proteolytic activity and comprised 66% of the applied protein mass (1.5 mg), the peak P1 without proteolytic activity was discarded. The purification procedures were summarized in Table 1. This active peak had high specific activity ($116 \text{ U mg protein}^{-1}$) and purification fold (25.1). The fractions of peak P2 were collected, combined, dialyzed and loaded on the anion-exchange chromatography.

5.4.6. Anion-Exchange Chromatography

The fractions of P2 gel-filtration chromatography (10.5 mL), dialyzed, lyophilized and loaded on the anion-exchange chromatography. Samples between 330 and 400 mM NaCl gradient, eluted in 2 peaks, containing total amount of 214 ug of protein (49.7% of the applied) (Fig. 6). The first peak (P1) was eluted in two fractions which contained 194 ug of protein with specific proteolytic activity of 62.45 U mg protein⁻¹ and purification fold of 13.52. Results have been reported by Harrach et al. [24], using Mono Q anion exchange chromatography of crude bromelain from pineapple stem resolved two acidic proteolytic components called SBA/a and SBA/b. Between 10 and 112 mM NaCl, 919 ug of protein (11.5% of the applied) eluted was resolved in 12 fractions without proteolytic activity. At 126 mM and 132 mM NaCl, respectively, two proteolytic components were found. Fraction 13, acidic bromelain stem proteinase a (SBA a⁻¹), with a specific activity of 0.13 U mg protein⁻¹, whereas fraction 14 (SBA b⁻¹) with a specific activity of 0.04 U mg protein⁻¹. What shows that stem and fruit bromelain are two different proteins, proved that pineapple bromelain is formed by a group of enzymes.

5.4.7. Cation-Exchange Chromatography

The CED80% was submitted to cation-exchange chromatography by applying 1 mL of samples to mono S HR 5/5 column. The chromatography was unsuccessful in the separation. Every applied protein was non-retained fraction, what should be due its acidic character or the closeness of its isoelectric points, which has been reported for fruit bromelain [17] and cysteine peptidase from unripe fruits of *Pseudananas macrodontes* [25].

5.4.8. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Zymogram

The molecular weight of the CE was estimated by SDS-PAGE. The result showed four bands of 40 kDa, 29 kDa, 26 kDa and one band of lower molecular weight smaller than 14 kDa (Fig. 7). Zymogram analysis revealed two caseinolytic bands for the CE, corresponding to the 29 kDa and smaller 14 kDa. Harrach et al. [24] showed among various lower molecular weight proteins, one dominant higher molecular protein band was detected (28 kDa). The enzyme was purified from gel-filtration chromatography, the peak (P2) was submitted electrophoresis SDS-PAGE appeared as a two similar bands corresponding to a molecular mass of 29 and 27 kDa respectively (Fig. 8). The fractions of P2 gel-filtration chromatography were found to be active protease, were collected, combined, dialyzed, lyophilized and loaded on the anion-exchange chromatography (mono Q HR 10/10) column. The fruit bromelain was purified a single peak (P1). This purified enzyme sample appeared as single band corresponding to a molecular weight of 29 kDa proving that the fruit bromelain is quite homogeneous proteinase from pineapple. Yamada et al., [17] showed that the molecular weights by SDS-PAGE analysis were 31 and 28 kDa for fruit bromelain. The native molecular weight of the purified bromelain was in agreement with that obtained by zymogram gels.

5.5. Conclusions

The CE from *Ananas comosus* L. Merrill, dialyzed and concentrated with 80% (w/v) ammonium sulphate, presented purification factor of about 3 times with activity recovery of 289% and activity specific of 18.25 U mg protein⁻¹. The CE and CED80% showed optimum pH of 8.5 and 7.2 respectively, and optimum temperature of 50 °C. The enzyme was stable at pH range of 5.0-9.0 and at temperatures range of 30-60 °C. The following values of apparent K_m e V_{max} was for azocasein: $K_m = 2.48 \text{ mg mL}^{-1}$ and $V_{max} = 35.29 \text{ U mL}^{-1}$ and azoalbumin $K_m = 2.94 \text{ mg mL}^{-1}$ and

$V_{\max} = 11.11 \text{ U mL}^{-1}$, revealed similar affinity for both substrates, but different catalytic efficiencies (31.62 min^{-1} for azocasein and 8.39 min^{-1} for azoalbumin). Electrophoresis SDS-PAGE of CE revealed four bands of 40 kDa, 29 kDa, 26 kDa and one band of lower molecular weight, smaller than 14 kDa, which by zymogram analysis was obtained two active bands for casein (29kDa and the smaller than 14kDa). The purification by gel-filtration chromatography presented one peak (P2) with activity proteolytic and two bands of 29 and 26 kDa on SDS-PAGE analysis. The purification by anion-exchange chromatography for P2 was homogenous on SDS-PAGE and its molecular weight was estimated to be 29 kDa according to zymogram for casein. The results showed that the purification procedures applied in this work were efficient to purify the fruit bromelain from pineapple.

5.6. Acknowledgments

The authors thank the financial support of CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília, Brasil), LIKA (Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami) and UFPE (Universidade Federal de Pernambuco).

5.7. References

- [1] Elss S, Preston C, Hertzog C, Heckel, F, Richling E, Schreier P. Aroma profiles of pineapple fruit (*Ananas comosus* [L.] Merr.) and pineapple products. LWT 2005;38:263–274.
- [2] Grabovac V, Bernkop-Schnurch A. Improvement of the intestinal membrane permeability of low molecular weight heparin by complexation with stem bromelain. Int. J. Pharm 2006;326:53–159.

- [3] Umesh Hebbar H, Sumana B, Raghavarao KSMS. Use of reverse micellar systems for the extraction and purification of bromelain from pineapple wates. Bioresour. Technol. doi:10.1016/j.biortech.2007.09.038, 2007.
- [4] Babu BR, Rastogi NK, Raghavarao KSMS. Liquid–liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system Chem. Eng. Process 2008;47:83–9.
- [5] Gupta P, Maqbool T, Saleemuddin M. Oriented immobilization of stem bromelain via the lone histidine on a metal affinity support. J. Mol. Catal. B: Enzym 2007;45:78–83.
- [6] Ralf Bahde MD, Daniel Palmes, MD, Evgeni Minin MD, Udo Stratmann MD, Ricarda Diller MD, Jörg Haier MD. Bromelain Ameliorates Hepatic Microcirculation After Warm Ischemia. J. Surg. Res 2007;139:88–96.
- [7] Shi W, Wei M, Jin L, Li C. Calcined layered double hydroxides as a “biomolecular vessel” for bromelain: Immobilization, storage and release. J. Mol. Catal. B: Enzym 2007;47:58–65.
- [8] Wen S, Huang THW, Li GQ, Yamahara J, Roufogalis BD, Li Y. Bromelain improves decrease in defecation in postoperative rats: Modulation of colonic gene expression of inducible nitric oxide synthase. Life Sci 2006;78:995-1002.
- [9] Kalra N, Bhui K, Roy P, Srivastava S, George J, Prasad S. Regulation of p53, nuclear factor κ B and cyclooxygenase-2 expression by bromelain through targeting mitogen-activated protein kinase pathway in mouse skin. Toxicol. Appl. Pharm 2008;226:30-37.
- [10] San-Lang W, Hue-Tin L, Tzu-Wen L, Yu-Jen C, Yue-Horng Y, Shian-Pin G. Reclamation of chitinous materials by bromelain for the preparation of antitumor and antifungal materials. Bioresour Technol (2007), doi:10.1016/j.biortech.2007.08. 035.
- [11] Leighton TJ, Doe RH, Warren RA. The relationship of serine protease activity to RNAPolymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. J. Mol. Biol 1973;76:103-22.

- [12] Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of proteinutilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem 1976;72:248-254.
- [13] Lineweaver H, Burk D. Determination of enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. Soc 1934;56:66.
- [14] Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nat 1970;27:680-685.
- [15] García-Careno FL, Dimes LE, Haard NF. Substrate-Gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases of proteinaceus proteinase inhibitors. Anal. Biochem 1993;214:65-9.
- [16] El-Beltagy AE, El-Adawy TA, Rahma EH, El-Bedawey AA. Purification and characterization of an acidic protease from the viscera of boliti fish (*Tilapia nilotica*). Food Chem 2004;86:33–9.
- [17] Yamada F, Takahashi N, Murachi T, Purification and characterization of a proteinase from pineapple fruit, fruit bromelain FA2. J. Biochem 1976;79:1223-34.
- [18] Guptaa P, Rizwan HK, Saleemuddin M. Binding of antibromelain monomeric FabVimproves the stability of stem bromelain against inactivation. Biochimica et Biophys. Acta 2003;1646:131-35
- [19] Lee KL, Albee KL, Bernasconi RJ. Complete amino acid sequence of ananain a comparison with bromelain and other plant cysteine protease. Biochem. J 1997;327:199-202.
- [20] Liang HH, Huang HH, Kwok KC. Properties of tea-polyphenol-complexed bromelain. Food Res.Int 1999;32:545-51.
- [21] Murachi T, Yamazaki M. Changes in conformation and enzymatic activity of stem bromelain in alkaline media. Biochem 1970;9:1935-1938.

- [22] Lima DC, Romanelli PF. Extração e estudo de algumas propriedades bioquímicas da enzima proteolítica do caule do abacaxi brando, variedade pérola. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos 1977;8:377-89.
- [23] Minami Y, Doi E, Hata T. Fractionation, purification, and some properties of proteolytic enzymes from stem bromelain. Agric. Biol. Chem 1971;35:1419-30.
- [24] Harrach T, Eckert K, Maurer HR, Machleidt, Machleidt W, Nuck R. Isolation and Characterization of Two Forms of an Acidic Bromelain Stem Proteinase. J. Protein Chem 1998;17:351-61.
- [25] Laura MIL, Sequeiros C, Claudia LN, Adriana Br, Bruno M, Donatella B, Nestor OC. Purification and Characterization of Macrodontain I, a Cysteine Peptidase from Unripe Fruits of *Pseudananas macrodontes* (Morr.) Harms (*Bromeliaceae*). Protein. Express and Purif 2000;18:133–40.

Table 1-

Purification fruit bromelain from *Ananas comosus* L. Merrill (pineapple)

Purification steps	Total activity (U mL ⁻¹)	Total protein (mg)	Specific activity (U mg protein ⁻¹)	Purification fold	Activity Yield (%)
CE	162.35	32.98	4.62	1	100
CED	469.2	36.84	18.28	3.08	289
CED80%	432	21.14	20.1	3.39	266
Fraction of Gel-filtration chromatography	11.78	1.02	116.65	25.1	7.2
Fraction of Anion-exchange Chromatography of P2 of gel-filtration	2.8	0.192	62.45	13.52	1.72

FIGURE CAPTIONS

Figure 1- Effect of pH on bromelain activity. The percent relative activity was calculated by considering the activity at pH 8.5 as 100% for (CE) and pH 7.2 as 100% for (CED 80%). Standard deviations were ± 2.0 % (based on three replicates).

Figure 2- Effect of temperature on bromelain activity. The percent relative activity was calculated by considering the activity at 50°C as 100% for (CE) and pH 50 as 100% for (CED80%). Standard deviations were ± 2.0 % (based on three replicates).

Figure 3- Effects of pH on the stability of the bromelain. Percent residual activity was measured at pH 8.5 for (CE). The activity of the enzyme before incubation was taken as 100%. Standard deviations were ± 2.0 % (based on three replicates).

Figure 4. The temperature stability of bromelain (CE). Percent residual activity was mensured at pH 8.5 for (CE). The activity of the enzyme before incubation was taken as 100%. Standard deviations were ± 2.0 % (based on three replicates).

Figure 5- Gel filtration chromatography of bromelain (CED80%) using FPLC system. Fractions of 1.5 mL were collected and assayed for proteins content and protease activity. Flow rate = 0.5 mL m⁻¹.

Figure 6- Anion-Exchange Chromatography of P2 (10.5mL) fractions, with proteolytic activity, dialyzed and liophylized from gel-filtration chromatography assay using FPLC system. Fractions

of 1.5 mL were collected and assayed for proteins content and protease activity. Flow rate = 1.0 mL m⁻¹.

Figure 7- (A) SDS-PAGE (15%) of fruit bromelain from pineapple. Lane 1: standard protein markers of different molecular weights, Lane 2: crude extract (CE) showing four bands after Coomassie brilliant blue staining. (B) Zymogram of CE in SDS-PAGE, showing two bands with proteolytic activity.

Figure 8- SDS-PAGE (15%) of fruit bromelain from pineapple. Lane 1: standard protein markers of different molecular weights, Lane 2: Peak (P2) of gel-filtration chromatography, showing two bands after Coomassie brilliant blue staining.

Figure 9- (A) SDS-PAGE (15%) of fruit bromelain from pineapple. Lane 1: standard protein markers of different molecular weights, Lane 2: Purified fruit bromelain after gel-filtration chromatography combined with anion-exchange chromatography showing single band after Coomassie brilliant blue staining, molecular weight value (29 kDa). (B) Zymogram of CE in SDS-PAGE, showing single band with proteolytic activity.

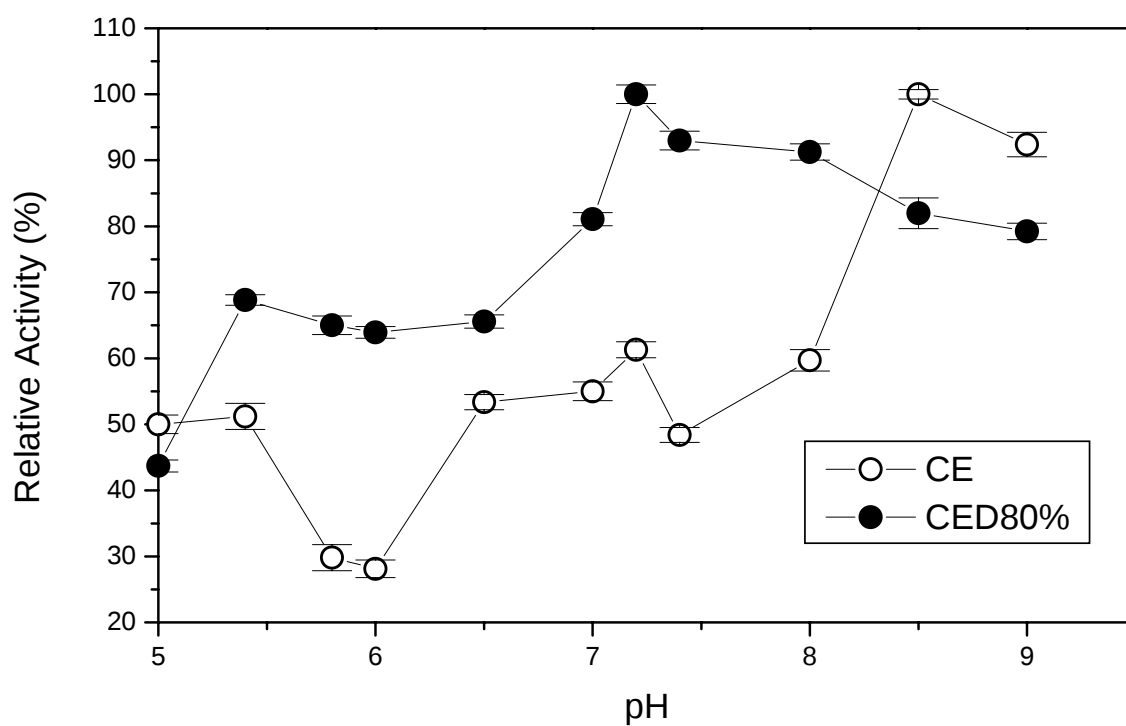


Figure 1

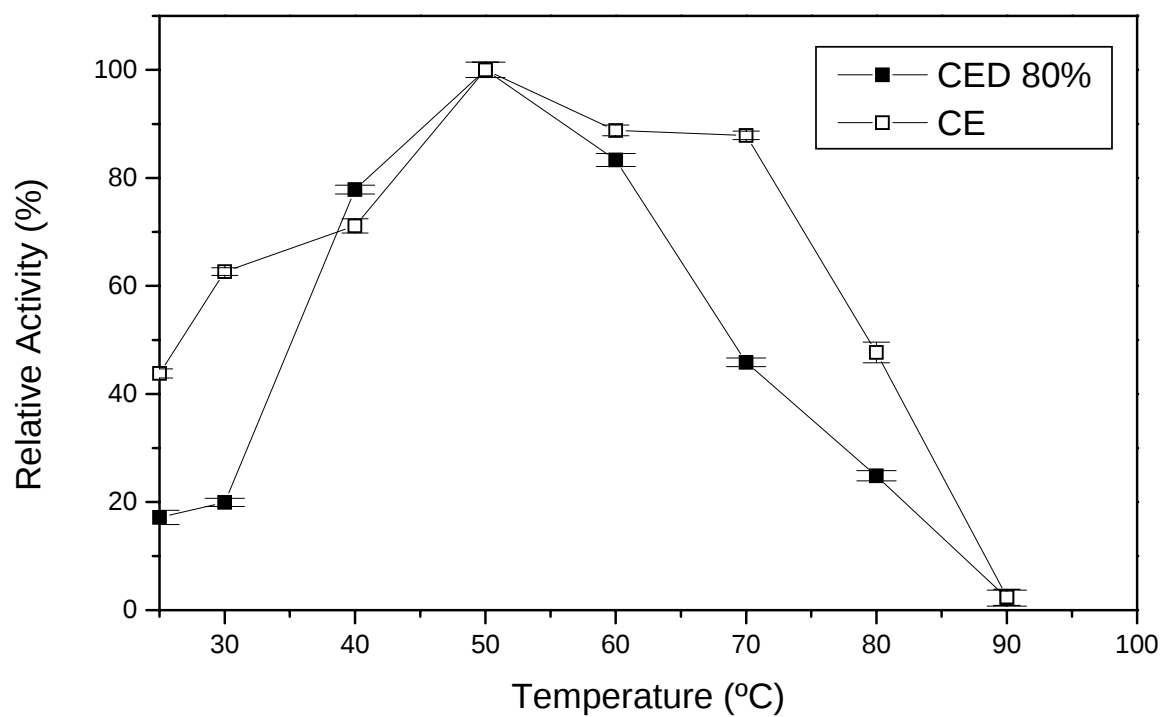


Figure 2

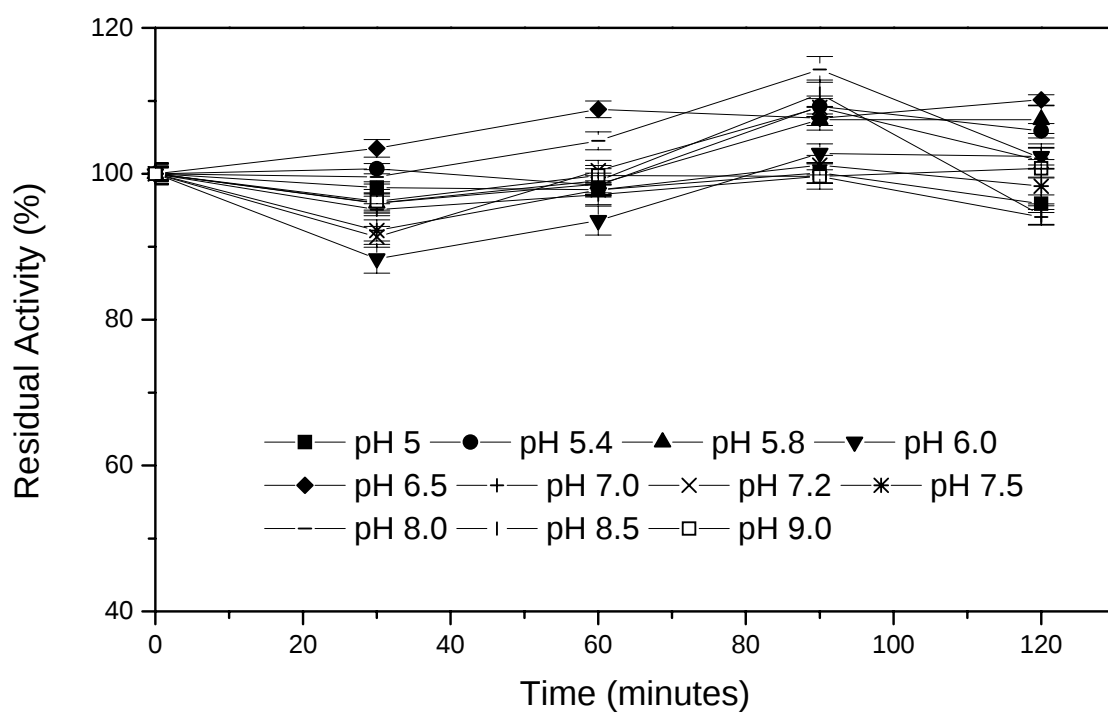


Figure 3

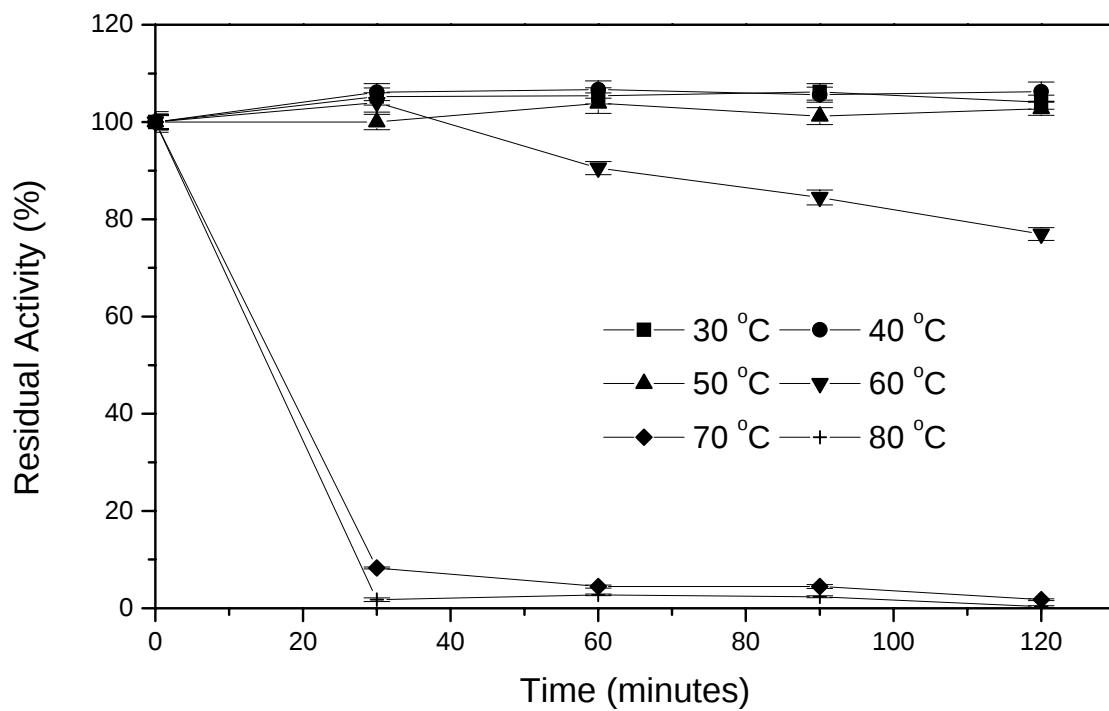


Figure 4

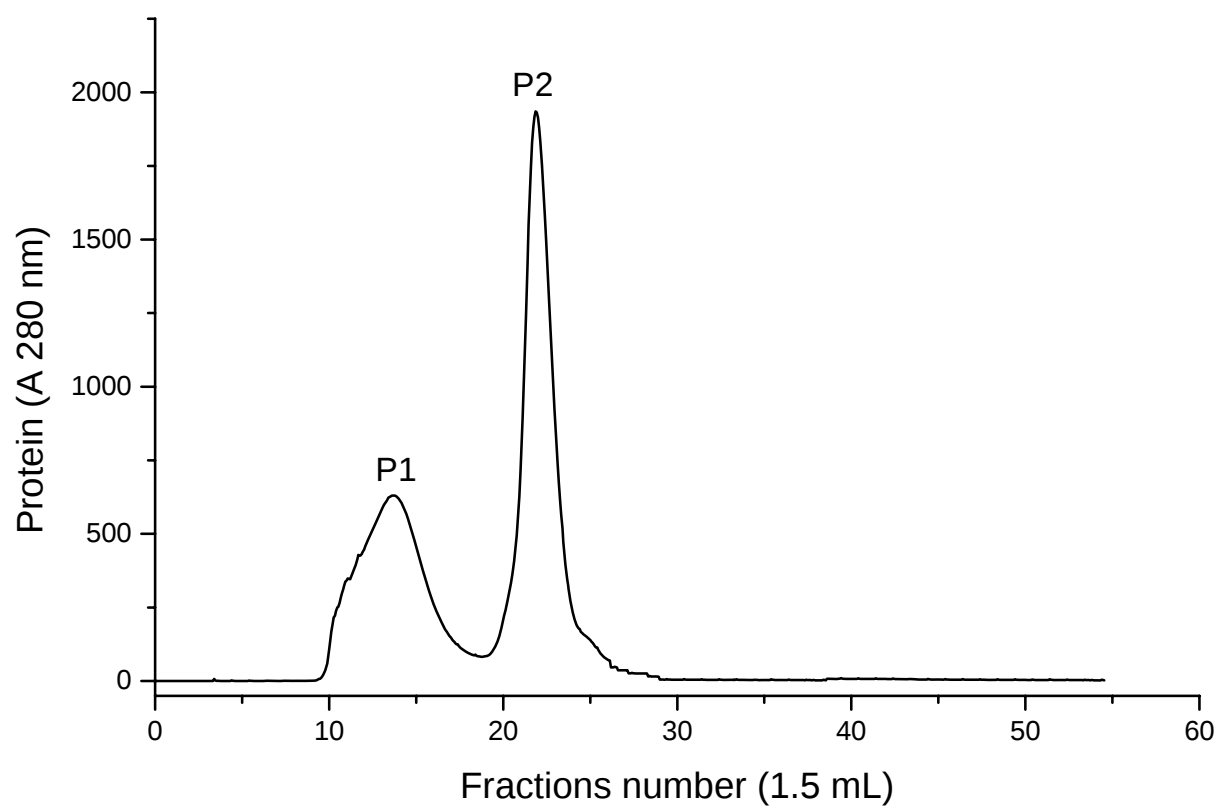


Figure 5

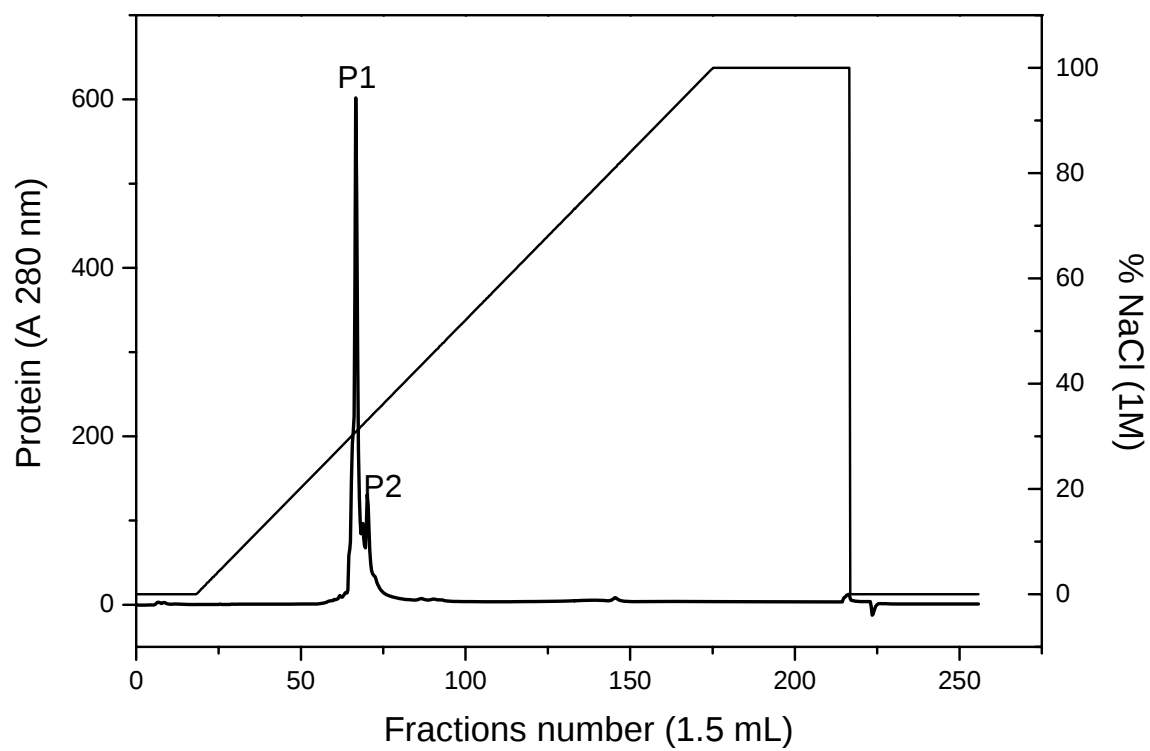


Figure 6

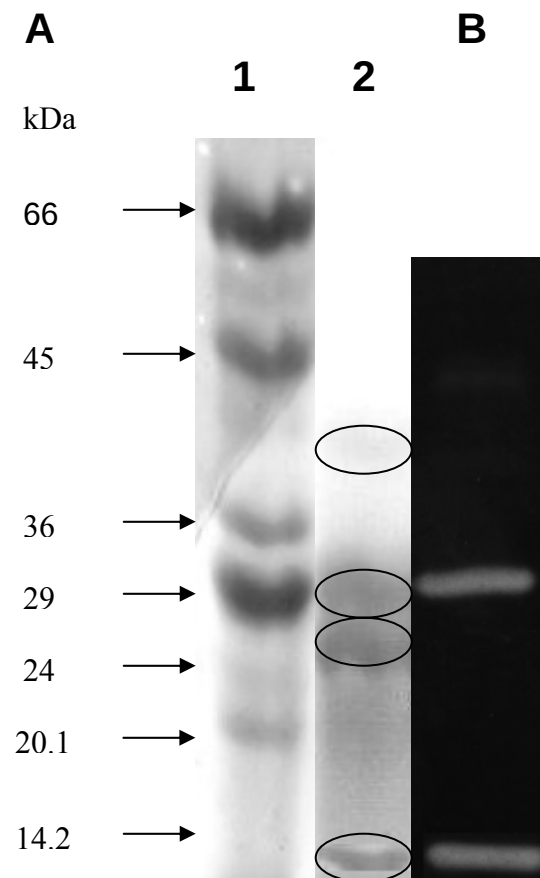


Figure 7

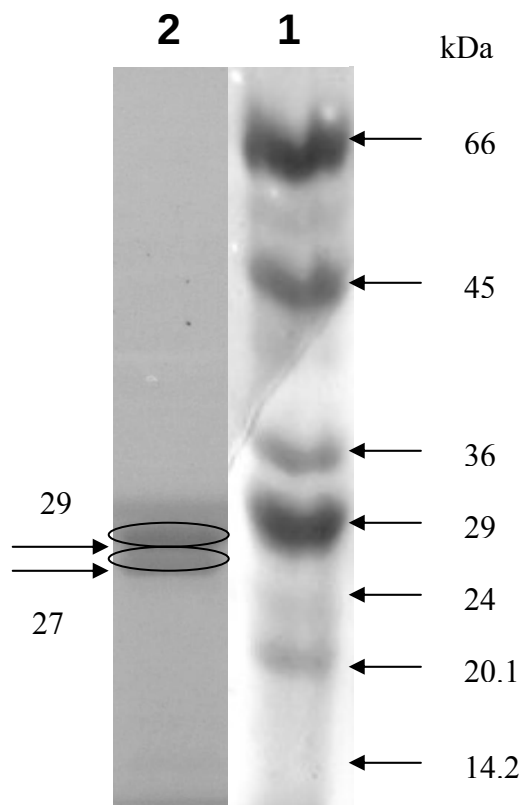


Figure 8

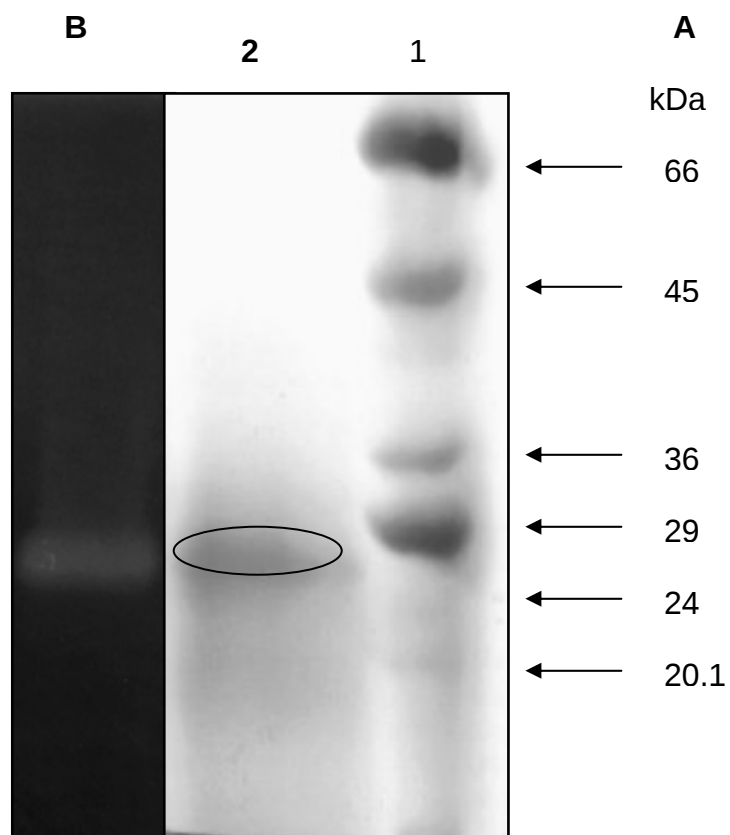


Figure 9

6. CONCLUSÕES

Os estudos realizados mostraram que:

- A diálise realizada no extrato bruto antes da adição dos 80 % de sulfato de amônio foi bastante eficiente, aumentando o fator de purificação cerca de 3 vezes, com recuperação de atividade de 289% e atividade específica 18,25 U/mg de proteína;
- Os extratos de bromelina do fruto do abacaxi (CE) e (CED80%) apresentaram atividades máximas em pH 8,5 e 7,2 respectivamente e temperatura ótima de 50 °C, entretanto o CE apresentou atividade e estabilidade em todas as faixas de pH avaliadas (5,0-9,0) e termoestabilidade até 60 °C, sendo totalmente desnaturada a 80 °C.
- Bromelina apresentou praticamente a mesma afinidade pela azocaseína e azoalbumina como substratos ($K_M = 2,48$ mg/mL e $V_{max} = 35,29$ U/mL e $K_M = 2,94$ mg/mL and $V_{max} = 11,11$ U/mL, respectivamente). Entretanto, a maior eficiência foi obtida para azocaseína ($31,62 \text{ min}^{-1}$), a qual foi 3,77 vezes maior que o valor encontrado para azoalbumina.
- O extrato bruto da bromelina (CE) apresentou 4 bandas protéicas de 40, 29, 26 kDa e a outra com peso molecular abaixo de 14 kDa, dentre as quais as bandas de 29 e de baixo peso mostraram atividade caseinólítica através de zimogramas.
- Cromatografia de gel filtração da fração CED80% apresentou dois picos, entretanto, apenas o segundo pico (P2) apresentou atividade proteolítica, com atividade específica de 108 U/mg de proteína e fator de purificação de 25 vezes. Esta fração apresentou duas bandas protéicas de 29 e 27 kDa em gel de SDS-PAGE.
- A fração P2 eluída através de cromatografia de troca aniônica apresentou um maior pico com atividade proteolítica e outro menor sem atividade. O pico (P1) com atividade proteolítica apresentou uma única banda de 29 kDa em gel SDS-PAGE, a qual mostrou atividade caseinólítica em zimogramas.

- Bromelina do fruto do abacaxi mostrou ter caráter ácido, pois não se ligou na coluna de cromatografia de troca catiônica.

7. ANEXOS

7.2. Resumos em Congressos

SILVA, R. A.;CADENA, P. G.; LIMA FILHO, J. L.; PIMENTEL, M. C. B. O fármaco bromelina: estudos físico-químicos e cinéticos. *XLVI Congresso Brasileiro de Química CBQ*. Salvador, 25 a 29 de setembro de 2006.

SILVA, R. A.;CADENA, P. G.; LIMA FILHO, J. L.; PIMENTEL, M. C. B. Purification of fruit bromelain from pineapple (*Ananas comosus*) perolera variety. *XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) and 10th International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB)*. Salvador, 21 a 25 de maio de 2007.

CADENA, P. G.; **SILVA, R. A.;** LIMA FILHO, J. L.; PIMENTEL, M. C. B. Biorreator de invertase imobilizada para produção de açúcar invertido. *XLVI Congresso Brasileiro de Química CBQ*. Salvador, 25 a 29 de setembro de 2006.

COUTO, F.; MELO, S.; SILVA, R.; PORTO, A.; NEVES REJANE. Seleção de leveduras para produção de β -glicosidase e pectinase. *5º Congresso Brasileiro de Micologia*. Recife-Pernambuco, 12 a 16 de novembro de 2007.