



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
MESTRADO EM BIOQUÍMICA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE TECIDUAL DE MELXI® E
BROMELINA POR VIA ORAL EM RATOS**

AURELINO CÂNDIDO DA SILVA

Orientador: Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Barros Pimentel

Recife-PE
2005



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
MESTRADO EM BIOQUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE TECIDUAL DE MELXI ® E
BROMELINA POR VIA ORAL EM RATOS**

Dissertação apresentada pelo
Mestrando Aurelino Cândido da
Silva, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do título de
Mestre em Bioquímica.

AURELINO CÂNDIDO DA SILVA

**Orientador: Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Barros Pimentel**

**Recife-PE
2005**

Silva, Aurelino Cândido da

Avaliação da toxicidade tecidual de Melxi® e bromelina por via oral em ratos / Aurelino Cândido da Silva. – Recife : O Autor, 2005.

36 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Bioquímica, 2005.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Bioquímica – Toxicologia. 2. Bromelina – Melxi® – Avaliação da toxicidade. 3. Enzimas – Bromelina – Aplicação terapêutica. I. Título.

577.152.34
572.76

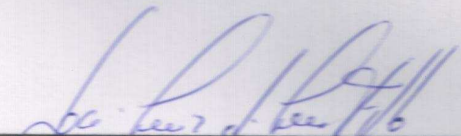
CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
BC2005-194

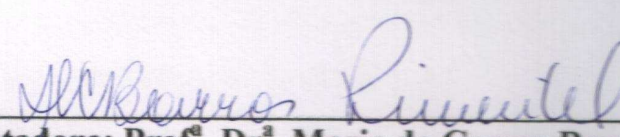


UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
MESTRADO EM BIOQUÍMICA

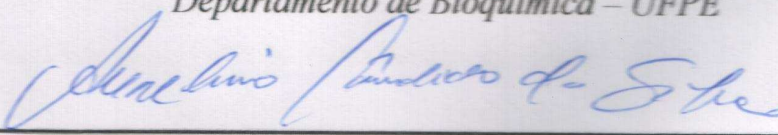
**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE TECIDUAL DE MELXI® E
BROMELINA POR VIA ORAL EM RATOS**



Orientador: Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho
Departamento de Bioquímica – UFPE



Co-orientadora: Prof^a. Dr.^a. Maria do Carmo Barros Pimentel
Departamento de Bioquímica – UFPE



Aurelino Cândido da Silva
Departamento de Bioquímica – UFPE

Recife-PE
2005

Dedicatória

*Aos meus pais, que me ensinaram a ter determinação e lutar pela vida.
Aos meus filhos, os anjos que me inspiram a amar a vida.*

Cândido, A. _____

AGRADECIMENTOS

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica da UFPE: Djalma, Miron, Ademar, Helena, Albérico, Flávio, João, Neide e demais funcionários pela prestimosa ajuda.

Aos funcionários do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami: Otaviano, Ana Helena, Felipe, Djalma, Carmelita e demais funcionários pela atenção e dedicação fundamentais nas diversas etapas deste estudo.

Aos professores do Mestrado em Bioquímica pela arte em transmitir seus conhecimentos, necessários à formação dos futuros pesquisadores.

Aos meus orientadores, Prof^ª. Dr^ª. Maria do Carmo Barros Pimentel e Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, os amigos *Carminha* e *Zé*, que com carinho se dedicam à pesquisa e ao ensino e que me inspiram com seu talento a continuar minha formação científica.

Ao Prof. Dr. Nicodemos Teles P. Filho pela interpretação dos laudos histopatológicos.

A Ana Catarina Leite, amiga e colega de Mestrado, pelas prestimosas dicas no manuseio com os animais.

Aos colegas do Mestrado: Amanda, Ana Helena, Bianka, Clébia, Eduardo & Susan, Gilvanelly, Joelma, Márcio & Mônica e em especial ao grande amigo Carlos Fernando pelos felizes momentos que juntos tivemos.

À minha Família, Ângela, Lininho e Aninha, pelos melhores momentos que tive o prazer em compartilhar. Aos meus pais, meus avós e aos que antes deles vieram e cujos espíritos zelam por sua descendência, agradeço.

ÍNDICE ANALÍTICO

	Página
AGRADECIMENTOS	i
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	v
ABREVIATURAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	09
1.1. Bioquímica	10
1.2. Farmacodinâmica	10
1.3. Ações Farmacológicas	11
1.3.1. Ação antiinflamatória e antiedematosa	11
1.3.2. Promoção da absorção de antibióticos	12
1.3.3. Coagulação e fibrinólise	13
1.3.4. Inibição do desenvolvimento tumoral	13
1.3.5. Modulação da atividade imune	13
1.3.6. Debridamento de tecidos necrosados	14
1.3.7. Combate a enteroinfecções e doenças inflamatórias intestinais	14
1.3.8. Agente mucolítico	14
1.4. Toxicidade	15
1.5. Argumentos para o Uso Clínico da Bromelina	15
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivos Gerais	16
2.2. Objetivos Específicos	16

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
4. ARTIGO CIENTÍFICO	22
5. ANEXOS	30

LISTA DE FIGURAS

	Página
Tese	
Figura 1. Ação proteolítica da bromelina.	11
Trabalho Científico	
Figure 1. Microscopic appearance of gastric tissues from selected animals from groups A (i), B (ii), C (iii) e D – control (iv). Hematoxylin & eosin, x 50.	27
Figure 2. Microscopic appearance of hepatic tissues from selected animals from groups A (i), B (ii), C (iii) e D - control (iv). Hematoxylin & eosin, x 50.	27
Figure 3. Microscopic appearance of renal tissues from selected animals from groups A (i), B (ii), C (iii) e D – control (iv). Hematoxylin & eosin, x 50.	27
Figure 4. Microscopic appearance of splenic tissues from selected animals from groups A (i), B (ii), C (iii) e D – control (iv). Hematoxylin & eosin, x 50.	27
Figure 5. Microscopic appearance of pulmonary tissues from selected animals from groups A (i), B (ii), C (iii) e D – control (iv). Hematoxylin & eosin, x 50.	27

LISTA DE TABELAS

	Página
<i>Tese</i>	
Tabela 1. Peptidases (bromelinas) do abacaxi (<i>A. comosus</i>)	10
<i>Trabalho Científico</i>	
Table 1. Study groups, number of animals and medication.	24
Table 2. Morphologic alterations in gastric, hepatic, splenic, renal and pulmonary tissues of the studied animals.	26

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Percentual
A2M	Alfa-2-macroglobulina
A2M-bromelina	Complexo supramolecular alfa-2-macroglobulina/bromelina
ADP	Adenosina difosfato
AINH	Antiinflamatório não hormonal
DL ₅₀	Dose letal para 50 % dos indivíduos
E.C.	Classificação internacional de enzimas
FNT- α	Fator de necrose tumoral alfa
g	Grama
g/dia	Grama por dia
g/kg	Grama por kilograma
g/ml	Grama por mililitro
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
IgE	Imunoglobulina E
IgE-mediada	Mediado(a) por imunoglobulina E
Il-1 β	Interleucina 1 beta
Il-2	Interleucina 2
Il-6	Interleucina 6
kD	Kilodalton
Kg	Kilograma
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
mg	Miligrama
mg/kg	Miligrama por kilograma
mg/ml	Miligrama por mililitro
ml	Mililitro
ml/kg	Mililitro por kilograma
P.I.	Ponto Isoelétrico
P.M.	Peso Molecular
S/A	Sociedade Anônima
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
X	Veze

RESUMO

O extrato bruto de bromelina é obtido a partir de vegetais da família das bromélias, em especial do abacaxi, contém proteínas e carboidratos, entre as proteínas encontramos as endo-petidases, fosfatases, glicosidases, peroxidases, celulasas, nucleases e os inibidores de proteases. 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. Extratos obtidos do caule e fruto do abacaxizeiro têm sido utilizados como medicamento desde o período pré-colombiano pelos curandeiros indígenas e pela população em geral até os dias atuais. Estudos *in vitro* e *in vivo* relatam diversas aplicações clínicas para a bromelina, como agente antiinflamatório, antitrombótico, digestório e mucolítico. Publicações recentes sugerem um papel importante para a bromelina no tratamento de doenças inflamatórias e infecciosas intestinais. A bromelina, assim como outros peptídeos, foi detectada no plasma após ingestão oral em humanos. Em camundongos foi detectada a presença da bromelina no plasma e em resíduos fecais, com atividade enzimática demonstrável em níveis biologicamente significativos, após administração oral. Estes resultados apontam a bromelina como um importante agente terapêutico de administração oral aplicável em um amplo espectro de patologias. Recentemente, foi comercialmente disponibilizado o Melxi®, medicação que combina o extrato de bromelina com o mel de abelha e que possui em sua atividade mucolítica sua principal indicação terapêutica. Com o objetivo de avaliar a toxicidade tecidual do Melxi® e da bromelina, estas substâncias foram administradas em altas concentrações em animais. Foram utilizados ratos *Wistar*, com idade entre 6 e 8 semanas e peso aproximado de 200 g. Os animais foram distribuídos em 4 grupos de 10 animais e receberam administração de solução oral, através de gavagem de Melxi® 20 ml/kg (grupo A), bromelina_[15mg/ml] 20 ml/Kg (grupo B), bromelina_[1g/Kg] 20 ml/Kg (grupo C) e NaCl_[0,9%] 20 ml/kg. Os animais foram observados por um período de 24 horas. Não foram detectadas alterações fisiológicas, lesões macroscópicas ou microscópicas em tecidos gástrico, hepático, renal, esplênico e pulmonar após a administração oral de Melxi® e bromelina em ratos, estes resultados indicam a bromelina e o Melxi® como medicações de origem natural e baixa toxicidade, aplicável em diversas situações clínicas.

ABSTRACT

‘Crude’ bromelain, an aqueous extract from pineapples, has been sold in health food stores as a nutritional supplement for “digestive aid”. It contains a mixture of different proteins, carbohydrates and other components. Cystein proteinases in crude bromelain are called *bromelains*, they are stem bromelain (EC 3.4.22.32), comosain, ananain (EC 3.4.22.31) and fruit bromelain (EC 3.4.22.33). *In vitro* and *in vivo* studies declare for bromelain a wide range of therapeutic benefits, such as treatment of inflammatory, blood-coagulation-related and malignant diseases. Recent reports suggest for bromelain a paper in infectious and inflammatory colits. Bromelain and other peptides have been documented in plasma after oral intake in humans and significant levels of enzymatic activity were detected in stools after oral administration in mice. Recently, Melxi ® a preparation containing bromelain in bee honey became commercially available. In order to evaluate the toxicity, large dosages of bromelain and Melxi ® in oral administration were used in rats. Pathogen-free *Wistar* female rats aged approximately 8 weeks were used. The animals were distributed in four groups, each comprising 10 animals. The rats received orally by gastric gavage Melxi® 20 ml/kg (group A), bromelain_[15mg/ml] 20 ml/Kg (groupo B), bromelain_[1g/Kg] 20 ml/Kg (group C) and NaCl_[0,9%] 20 ml/kg (group D). After 24 hours, the rats were sacrificed, lungs, stomach, liver, spleen and kidneys sections were stained with hematoxylin and eosin for morphological study. No macroscopic or microscopic morphological alterations were observed. These results claim for bromelain and Melxi® a paper in oral therapy for a set of clinical applications.

1. INTRODUÇÃO

O extrato de proteínas obtido a partir dos vegetais da família *bromeliaceae*, cujo membro mais conhecido é o abacaxi, é genericamente denominado **BROMELINA** e pode ser obtido do fruto, folhas e talo. Este extrato bruto possui diferentes proteínas destacando-se as peptidases e os inibidores de proteinases (Maurer, 2001).

A bromelina tem diversos usos, todos baseados em sua atividade proteolítica. Na indústria tem sido aplicada no amaciamento de carnes, clarificação de cervejas, fabricação de queijos, preparo de alimentos infantis e dietéticos, no pré-tratamento de soja, no amaciamento do couro e na indústria têxtil no tratamento da lã e da seda.

O uso medicinal do abacaxi é conhecido desde os tempos dos indígenas americanos nativos, de acordo com os relatos de Thévet (1558): “ *the fruit of which the natives of America make the greatest medicinal use is called **nana** (ananas)* “ ou de Rochefort (1605) : (o suco do abacaxi) “*admirably recreates and exhilarates the spirits and comfort the heart; it also fortifies the stomach, cureth queasiness and causeth appetite; it gives present ease to such as are troubled with the stone or stoppage of urine; may it destroys the force of poyson*“ (Taussig & Batkin, 1988).

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 da bromelina (Maurer, 2001; Hale *et al.*, 2002).

O extrato de bromelina tem sido utilizado na Europa e nos Estados Unidos como complemento alimentar digestivo, como antiinflamatório em alternativa aos agentes antiinflamatórios não hormonais e na prevenção de tromboembolismo. No Brasil, o extrato de bromelina, associado ao mel de abelha, tem sido utilizado como agente mucolítico em preparação comercial. Relatos científicos descrevem as atividades da bromelina *in vitro* e *in vivo*, que demonstrou efeitos antiinflamatórios, antitrombóticos, trombolíticos, imunomoduladores, mucolíticos, antitumorais e no debridamento de tecidos necrosados.

Recentemente, o laboratório Hebron S.A. lançou no mercado o Melxi ®, medicamento que associa extrato de bromelina e mel de abelha, que tem em seu papel mucolítico sua principal indicação terapêutica.

1.1. Bioquímica

O extrato bruto da bromelina é industrialmente obtido a partir da polpa do abacaxi, contém proteínas e carboidratos, entre as proteínas encontramos as endopeptidases, fosfatases, glicosidases, peroxidases, celulasas, nucleases e os inibidores de proteases. 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 (Cooreman, 1978; Napper *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1997; Harrach *et al.*, 1998).

Tabela 1. Peptidases (bromelinas) do abacaxi (*A. comosus*)

Nome	P.M.	P.I.	Sequência	Glicosilação	Fonte
Bromelina do talo	23.800 D	> 10	212 aa	+	Harrach, 1998
Ananaina	23.464 D	> 10	216 aa	-	Harrach, 1998 Lee, 1997
Comosaina	24.509 D	> 10	-	+	Harrach, 1998
	23.550 D	4.8		++	Napper, 1994
Comosaina	24.509 D	> 10	-	+	Harrach, 1998
	23.550 D	4.8		++	Napper, 1994

1.2. Farmacodinâmica

Após a ingestão oral, a bromelina sofre a ação proteolítica do suco gástrico, sendo inativada em sua maioria. Relatos demonstram que parte da bromelina é absorvida e pode ser detectada no plasma em formas moleculares de alto peso, por técnicas de marcação isotópica (Seifert *et al.*, 1979), detecção imune ou atividade enzimática específica (Kolac *et al.*, 1996; Castell *et al.*, 1997; Maurer *et al.*, 1996), tendo sido demonstrado que o mesmo ocorre com outras enzimas, como a tripsina (Mai *et al.*, 1996; Donath *et al.*, 1997). A diminuição da inativação pelo suco gástrico pode ser obtida com a preparação de formulações de liberação entérica, aumentando os níveis de detecção da bromelina no plasma em humanos (Castell *et al.*, 1997). A associação com antiácidos na administração oral permitiu que a bromelina atravessasse intacta todo o trato gastrointestinal em quantidades diminutas, permitindo sua detecção em fezes de

camundongos e em maiores concentrações plasmáticas, em comparação a administração em solução salina (Hale, 2004).

No plasma, a bromelina complexa-se aos inibidores de proteases alfa-2-macroglobulina ($\alpha 2M$) e alfa-1-antiquimiotripsina (Castell *et al.*, 1997), apesar de manter sua atividade proteolítica mesmo no complexo $\alpha 2M$ -bromelina, o acesso aos substratos fica limitado a moléculas menores, por problemas de difusibilidade (Laurer, 2001). O complexo $\alpha 2M$ -bromelina é fagocitado por células com receptores “scavenger”, principalmente no fígado, sendo posteriormente metabolizados por proteases lisossômicas (Chu *et al.*, 1994).

1.3. Ações Farmacológicas

A bromelina atua primariamente por ação proteolítica direta, hidrolizando ligações peptídicas, preferencialmente onde forem encontrados resíduos de alanil, glicil e leucil, atuando sobre substratos diversos, desde tripeptídeos cromogênicos até proteínas de alto peso molecular, incluindo caseína, fibrina e albumina. 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).

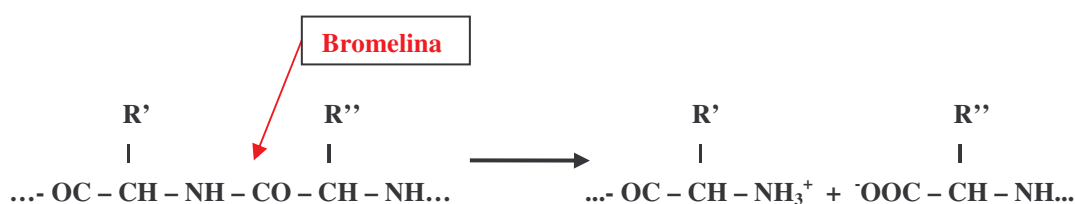


Figura 1. Ação proteolítica da bromelina.

1.3.1. Ação Antiinflamatória e Antiedematosa

A bromelina é capaz de diminuir o edema provocado em modelos animais, efeito não conseguido com outra proteinase, a papaína. A bromelina demonstrou eficácia em

prevenir o edema provocado por carragenina em 41 % dos animais e em 45 % com o uso de dextrana (Netti *et al.*, 1972), apresentou a maior eficácia na prevenção do edema induzido entre indometacina, AAS e oxifenbutazona (Uhlig & Seifert, 1981).

Estudos diversos demonstraram a capacidade *in vitro* da bromelina em diminuir a secreção por células imunes de mediadores inflamatórios (Mynott *et al.*, 1999; Mynott *et al.*, 2002). Diversos estudos de doenças inflamatórias humanas e em modelos animais foram conduzidos. Estes modelos incluíram 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, 2000; Brown, 2000), encefalomielite alérgica experimental, um modelo para esclerose múltipla humana (Targoni *et al.*, 1999) e rinite alérgica IgE-mediada (Thornhill & Kelly, 2000). Efeitos benéficos foram comprovados por todos estes experimentos.

A bromelina demonstrou eficácia similar a outros medicamentos antiinflamatórios padrões. Uma dose de bromelina de 10 mg/kg i.v. mostrou 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 apresentou atividade similar ou maior que os antiinflamatórios não hormonais (AINH), em estudos reumatológicos em humanos (Masson, 1995; Witterborg *et al.*, 2000; Brown, 2000).

1.3.2. Promoção da Absorção de Antibióticos

A bromelina aumenta a absorção de antibióticos quando administrados em associação por via oral. Neubauer (1961) avaliou a terapia associada em pacientes hospitalizados com pneumonia, bronquite, infecções por estafilococos, tromboflebites, pielonefrites e abscessos retais. Foi observada redução na morbidade em todos os pacientes submetidos à terapia combinada, em comparação aos pacientes que receberam antibioticoterapia isolada. Outros relatos demonstraram que a administração de bromelina aumenta a absorção de penicilina, amoxicilina e tetraciclina, tanto por administração oral quanto por administração intramuscular e subcutânea, obtendo-se níveis plasmáticos mais elevados dos antibióticos e menores índices de complicações (Renzini & Varengo, 1972; Tinozzi & Venegoni, 1978; Friesen *et al.*, 1987).

1.3.3. Coagulação e Fibrinólise

A administração de bromelina em humanos, especialmente em indivíduos com contagem plaquetária elevada diminuiu a agregação plaquetária induzida por ADP (Heinecke *et al.*, 1972). Outros relatos descrevem o isolamento de frações da bromelina envolvidas na diminuição da agregação plaquetária (Ako *et al.*, 1981; Metzlig *et al.*, 1999).

A bromelina demonstrou *in vitro* capacidade em ativar o plaminogênio à plasmina, que cliva a fibrina. Esta propriedade é compartilhada com a estreptoquinase, porém, em contraste com a estreptoquinase a bromelina não demonstrou eficiência em dissolver agregados de fibrina já formados (Maurer, 2001).

1.3.4. Inibição do Desenvolvimento Tumoral

Estudos empíricos relataram que a administração oral de bromelina em pacientes portadores de câncer melhorou a sobrevida com baixos índices de efeitos colaterais (Gerard, 1972; Nieper, 1976). 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). Outros relatos descrevem a atividade da bromelina na inibição da invasibilidade tumoral e metástases de melanoma e tumor de mama em modelos animais (Batkin *et al.*, 1988; Grabowska *et al.*, 1997).

1.3.5. Modulação da Atividade Imune

A bromelina, assim como a papaína demonstrou capacidade em estimular células monócíticas a produzir elevadas quantidades de fator de necrose tumoral alfa (FNT- α) e interleucinas (Il-1 β , Il-2 e Il-6), *in vitro* (Desser & Rehberger, 1990; Desser *et al.*, 1993; Desser *et al.*, 1994). Estas citocinas são importantes mediadores na ativação dos leucócitos e na inibição do crescimento de células tumorais. Outros relatos descrevem a remoção de marcadores de superfície celular em leucócitos, alterando a capacidade de

adesão celular, importante na regulação da atividade das células imunes (Desser *et al.*, 1994; Eckert *et al.*, 1999; Mynott *et al.*, 2002; Hale, 2002).

1.3.6. Debridamento de tecidos necrosados

A remoção de tecidos desvitalizados é um mecanismo eficaz de combate à morbimortalidade em pacientes com fasciíte, abscessos e queimaduras de terceiro grau. O debridamento químico, em comparação ao cirúrgico, remove seletivamente apenas os tecidos necrosados. O uso de bromelina em base lipídica como tratamento para queimaduras experimentais em ratos, demonstrou debridamento completo em período menor, em comparação ao uso de colagenase (Klaue *et al.*, 1979). Outros relatos demonstraram o debridamento seletivo em modelos experimentais, sem comprometimento dos tecidos não desvitalizados (Houck *et al.*, 1983; Ahle & Hamlet, 1987).

1.3.7. Combate a enteroinfecções e doenças inflamatórias intestinais

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram diversos mecanismos através dos quais a bromelina mostrou capacidade de combater doenças inflamatórias e infecciosas intestinais. 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 modelo animal, a bromelina promoveu alterações proteolíticas nos receptores k88 de enterócitos de leitões, impedindo a adesão de *E. coli* k88+ enteropatogênica à mucosa intestinal, prevenindo a enteroinfecção na maioria dos animais (Chandler & Mynott, 1998). Em humanos, a administração oral de bromelina promoveu a remissão dos sintomas em pacientes com retocolite ulcerativa (Kane & Goldberg, 2000).

1.3.8. Agente mucolítico

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 (King & Rubin, 2002).

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 & Rubin, 2002).

1.4. Toxicidade

Estudos pré-clínicos demonstraram a segurança da administração oral de bromelina, mesmo em doses altas como 12 g/dia em humanos (Castell *et al.*, 1997). A DL₅₀ da bromelina foi determinada em roedores (Moss *et al.*, 1963), correspondendo a 37 e 85 mg/kg para via intraperitoneal e 30 e 20 mg/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.

1.5. Argumentos para o Uso Clínico da Bromelina

Maurer (2001), lista os seguintes argumentos para o uso clínico da bromelina:

- A bromelina pertence a um grupo de enzimas proteolíticas com diversas aplicações comprovadas.
- A bromelina é um agente fitoterápico, com poucos efeitos tóxicos, favorecendo sua aceitação pelos pacientes.
- A bromelina é absorvida por via oral com efeito sistêmico comprovado, facilitando sua administração.
- Dados publicados demonstram atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*, indicando a bromelina como um possível agente terapêutico antineoplásico.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Avaliar a toxicidade tecidual do Melxi® e da bromelina por administração oral.

2.2. Objetivos Específicos

- 2.2.1. Realizar a administração oral de Melxi® e de bromelina em suspensão aquosa em elevadas quantidades em ratos *Wistar*.
- 2.2.2. Avaliar possíveis alterações fisiológicas decorrentes do uso destas substâncias.
- 2.2.3. Avaliar a toxidade destas substâncias através do estudo histopatológico de tecidos selecionados, estômago, pulmão, fígado, rim e baço.
- 2.2.4. Comparar estes tecidos aos obtidos de animais submetidos à administração oral de solução salina isotônica: NaCl 0,9 % (grupo controle).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- CHU, C.T.; OURY, T.D.; ENGHILD, J.J.; PIZZO, S.V. Adjuvant free in vivo targeting. Antigen delivery by alpha-2-macroglobulin enhances antibody formation. **Journal of Immunology**, v. 152, p. 1538-1545, 1994.
- COOREMAN, W. - Bromelain. In: Pharmaceutical Enzymes-Properties and Assay Methods, p. 107-121, 1978. Ruyssen R. and Lauwers A. (ed), E. Story-Scientia Scientific Publishing Co. Gent./Belgium.
- 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.; KOKRON, E.; PAUKOVISTIS, W. Cytokine synthesis in human peripheral blood mononuclear cells in vitro after oral administration of polyenzymes preparations. **Oncology**, v. 50, p. 403-407, 1993.
- 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.

- DONATH, F.; ROOTS, I.; MAI, I.; MAURER, A. WOOD, G. R.; KUHUN, C. S.; FRIEDRICH, G. Dose related bioavailability of bromelain and trypsin after repeated oral administration. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 52, Suplemento A, p. 146, Resumo 453, 1997.
- ECKERT, K.; GRABOWSKA, E.; STANGE, R.; SCHNEIDER, U.; MAURER, H. R. Effects of oral bromelain administration on the impaired immunocytotoxicity of mononuclear cells from breast cancer patients. **Oncology Reports**, v. 6, p. 1191-1199, 1999.
- 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.
- 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.
- GERARD, G. Therapeutic anti-cancereuse et bromelaine. **Agressologie**, v. 13, p. 261-274, 1972.
- 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.
- 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, L.P.; GRERER, 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.
- 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. 351-361, 1998.
- 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.

- KANE, S.; GOLDBERG, M. J. Use of Bromelain for Mild Ulcerative Colitis. **Annals of Internal Medicine**, v. 132, p. 680, 2000.
- 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.
- KLAUE, P.; DILBERT, G.; HINKLE, G. Tieexperimentelle Untersuchngen zur enzymatischen Lokalbehandlung subdermaler Verbrennungen mit Bromelain. **Therapiewoche**, v. 29, p. 796-799, 1979.
- KOLAC, C.; STREICHHAN, P.; LEHR, C. M. Oral bioavailability of proteolytic enzymes. **European Journal of Pharmacology**, v. 42, p. 222-232, 1996.
- LAURER, D.; BIRKENMEIER, G.; Alpha-2-macroglobulin-mediated degradation of amyloid beta-1-42: a mechanism to enhance amyloid beta catabolism. **Experimental Neurology**, v. 167, p. 385-392, 2001.
- 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.
- MAI, I. ; DONATH, F.; MAURER, A.; BAUER, S.; ROOTS, I. Oral Bioavailability of bromelain and trypsin after repeated oral administration of a commercial polyenzyme preparation. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 50, p. 548, 1996.
- 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. 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 reduce human platelet aggregation in vitro and in vivo. **In vivo**, v. 13, p. 7-12, 1999.
- 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.
- 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.
- 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.; 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.
- NAPPER, A. D.; BENETH, S. P. BOROWSKY. 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 of proteolytic enzymes administered orally compared with antiphlogistic compounds. **Illustrated Pharmacology**, v. 8, p. 453-466, 1972.
- NEUBAUER, R.A. A plant proteinase for potentiation of and possible replacement of antibiotics. **Experimental Medicine and Surgery**, v. 19, p. 143-160, 1961.
- NIEPER, H. A. Bromelain in der Kontrolle malignen Wachstums. **Krebgeschehen**, v. 1, p. 9-15, 1976.
- 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.
- 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.
- RENZINI, G.; VARENGO, M. Die Resorption von Tetrazyklin in Gegenwart von Bromelain bei oraler Applikation. **Arzneimittel-Forscher**, v. 2, p. 410-412, 1972.

- 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.
- 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.
- TAUSSIG, S.J. AND BATKIN, S. Bromelain, The Enzyme Complex of Pineapple (*Ananas comosus*) and Its Clinical Application, na 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, I. Die Wirkung proteolytischer Enzyme auf das posttraumatische Syndrom. **Fortschritte der Medizin**, v. 15, p. 554-556, 1981.
- WITTENBORG A, BOCK PR, HANISCH J, SALLER R, SCHNEIDER B. Comparative epidemiological study in patients with rheumatic diseases illustrated in a example of a treatment with non-steroidal anti-inflammatory drugs versus an oral enzyme combination preparation. **Arzneimittel-Forschung**, v. 50, p. 728-738, 2000.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

EFFECT OF BROMELAIN AND MELXI ® AFTER ORAL ADMINISTRATION OF LARGE DOSES IN RATS

TRABALHO A SER SUBMETIDO À REVISTA *GUT*

Effect of bromelain and Melxi ® after oral administration of large doses in Rats

Cândido, A.; Pontes, N. T.; Pimentel, M.C.B.; Lima-Filho, J.L. (*)

(*) Corresponding author

- Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA) - Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).
- Departamento de Bioquímica – UFPE.
- Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária - CEP. 50670-901, Recife PE Brasil.
- zeluiz@lika.ufpe.br

Abstract

‘Crude bromelain’, the aqueous extract from pineapples contains a mixture of different proteins, carbohydrates and other components. Cystein proteinases in crude bromelain are called *bromelains*. Studies declare for bromelains therapeutic benefits, such as treatment of inflammation, blood-coagulation-related and malignant diseases. Melxi®, commercially available from HEBRON Laboratories. It contains approximately 15 mg/ml of bromelain in bee honey. Melxi® has been advised by the manufacturer as a mucolytic agent. Bromelain hydrolyzes peptide bonds and reduces the disulfide bond of mucin, reducing the elasticity and viscosity of mucus. In order to evaluate the toxicity, large dosages of bromelain and Melxi® were used by oral administration in rats. Pathogen-free *Wistar* female rats aged approximately 8 weeks received orally 20 ml/kg of Melxi®, bromelain [15mg/ml], bromelain [500 mg/ml] and 0.9 % NaCl (control). After 24 hours, the rats were sacrificed. Lungs, stomach, liver, spleen and kidneys were stained with hematoxylin and eosin for morphological study. Our results demonstrated no physiological nor morphological alterations in gastric, hepatic, renal, splenic and pulmonary tissues. These results suggest for Melxi® and bromelain a paper in oral therapy with low toxicity.

Introduction

‘Crude bromelain’ is an aqueous extract from the stems and fruits of pineapples (*Ananas comosus*) and it contains a mixture of different proteins, carbohydrates, other components¹ and a complex set of enzymes^{2, 3}. The cystein proteinases found in bromelain are stem bromelain (EC 3.4.22.32), comosain, ananain (EC 3.4.22.31) and fruit bromelain (EC 3.4.22.33)¹.

In vitro and *in vivo* studies claim for bromelains a wide range of therapeutic benefits, such as treatment of inflammatory, blood-coagulation-related and malignant diseases¹. It has been also reported that bromelain enhances the tissue permeability of penicillins and tetracyclines⁴⁻⁶.

Although lethal doses have been reported by Moss⁷ in 1963, there is still a few data that document the toxicity bromelain, and there is no report of Melxi® toxicity. The purpose of this study was to evaluate the oral toxicity of bromelain and Melxi®.

Materials and methods

Pathogen-free *Wistar* female rats aged approximately 8 weeks were obtained from Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco. Four groups, each comprising 10 animals, were studied. The rats received orally by gastric gavage 20 ml/kg of the studied substances, Group A: Melxi®, group B: bromelain [15mg/ml], group C: bromelain [500 mg/ml] and group D (control): 0.9 % NaCl. Study groups are summarized in table 1.

Animals were housed in autoclaved cages and bedding in an air-conditioned room on a 12-h light:12-h dark cycle. Irradiated food and acidified water were provided *ad libitum* throughout. All experimental procedures complied with the requirements of the Animal Care and Ethics Committee of the Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco.

Functional alterations were evaluated during 24 hours after the first oral administration, according to Brown & Malone observations for natural substances toxicity⁸. After this initial observation, the rats were anesthetized by intra peritoneal (i.p.) injection of 2.5 mg sodium pentobarbital and sacrificed by cardiac puncture exsanguination. Lungs, stomach, liver, spleen and kidneys surgically obtained were fixed with 10 % phosphate-buffered formalin then embedded in paraffin and sectioned 5 µm. Tissue sections were stained with hematoxylin and eosin for morphological study.

Table 1. Study groups, number of animals and medication.

	N*	Medication	Dose
A	10	Melxi®	20 ml/kg
B	10	Bromelain [15 mg/ml]	20 ml/kg
C	10	Bromelain [500 mg/ml]	20 ml/kg
D	10	NaCl [0.9 %]	20 ml/kg

(*) *N*: number of animals.

Doses were fractionated in four applications

Results and Discussions

Vegetable substances have been widely used in a large number of medications. Toxicity studies with these natural source substances have been performed with documented side effects. Brown & Malone reported a review and classified the chief physiological and morphological alterations secondary to the use of these substances⁸.

During this study, no physiological nor gastric, hepatic, splenic, renal and pulmonary tissues morphological alterations were observed in rats after oral administration of bromelain and Melxi® in large amounts, even in doses up to 20 times higher than those used in human therapeutics. The tissues were microscopically comparable to control group tissues (Figures 1-5). Table 2 summarizes the experimental results.

Human adult intestinal epithelium has traditionally been thought to be impermeable to proteins. In spite of gastric inactivation, fulllength proteolytically active bromelain has been documented in plasma from healthy male volunteers after oral administration of enteric-coated tablets. This was shown unequivocally by immunoprecipitation with anti-bromelain antibody, gel electrophoresis, and immunodetection with a second anti-bromelain antibody, as well as by immunoassay and proteolysis of model substrates⁹, other studies reported that bromelain has been

documented in plasma after oral intake in animals¹⁰⁻¹³. Recently, bromelain was detected serum and stools of mice after oral administration in biologically significant levels of enzymatic activity, particularly using formulations containing antacid¹⁴. These results deny the traditional idea that proteins are totally inactivated in gastrointestinal tract and supports the oral administration of Melxi® and bromelains.

Recent results claim for bromelain a paper in the treatment of gastrointestinal inflammatory and infectious diseases. Bromelain inhibits intestinal secretion caused by *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* enterotoxins¹⁵ and *Salmonella typhimurium* invasion in human macrophage-like cells¹⁶. It also protected piglets from diarrhea caused by K88+ enterotoxigenic *Escherichia coli*¹⁷ and promoted remission of ulcerative colitis that was refractory to conventional treatments in two patients¹⁸.

Bromelain were used in a variety of inflammatory diseases and models of inflammation with benefic effects. These studies included carrageenan-induced pleurisy in the rat¹⁹⁻²¹, arteriosclerosis in rat aortic allografts²², experimental allergic encephalomyelitis (EAE) model for the human autoimmune disease multiple sclerosis²³, IgE-mediated perennial allergic rhinitis²⁴ and human rheumatologic diseases²⁵⁻²⁷. The specific pathogenetic mechanisms vary in these different models and diseases, but each is characterized by excessive inflammatory activity. Some of these studies compared bromelain with standard anti-inflammatory drugs. A dose of 10 mg/kg i.v. bromelain had activity similar to 0.3 mg/kg i.p. dexamethasone in rat pleurisy models^{20,21}. Bromelain had efficacy similar to or better than classic non-steroidal anti-inflammatory agents (NSAIDs) in some rheumatologic studies in humans²⁵⁻²⁷.

Bromelain has also an important mucolytic activity, it has cysteine domains that act reducing S-S bridges between neighboring mucin macromolecules, activity similar to N-acetylcysteine. The proteolytic activity hydrolyses the mucin chains. These two actions of bromelain degrade the three-dimensional network that forms the mucous gel¹⁸.

Recent reviews have signed for bromelain and Melxi® a paper in the therapeutic as antiinflammatory, antitrombotic immunomodulator and antineoplastic agent¹.

Table 2. Morphologic alterations in gastric, hepatic, splenic, renal and pulmonary tissues of the studied animals.

Group A: Melxi®.

Number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Weight (g)	200	190	190	220	200	210	220	200	215	205
Dose (ml)	2,0	1,9	1,9	2,2	2,0	2,1	2,2	2,0	2,2	2,1
Tissue alterations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Group B: Bromelain 15 mg/ml.

Number	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Weight (g)	210	230	200	220	220	200	210	190	200	210
Dose (ml)	2,1	2,3	2,0	2,2	2,2	2,0	2,1	1,9	2,0	2,1
Tissue alterations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Group C: Bromelain 500 mg/ml.

Number	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Weight (g)	220	200	215	205	220	195	215	210	200	210
Dose (ml)	2,2	2,0	2,2	2,1	2,2	2,0	2,2	2,1	2,0	2,1
Tissue alterations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Group D: 0.9% NaCl (control).

Number	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Weight (g)	200	200	200	225	200	230	210	220	195	215
Dose (ml)	2,0	2,0	2,0	2,3	2,0	2,3	2,1	2,2	2,0	2,2
Tissue alterations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

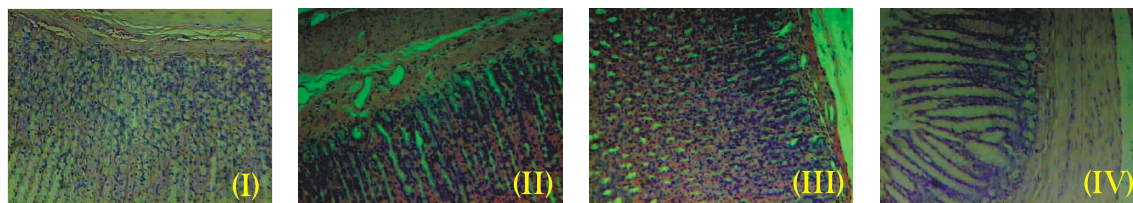


Fig. 1: Gastric corpus of rats, after oral administration of 20 ml/kg Melxi® (I), bromelain [15 mg/ml] (II), bromelain [500 mg/ml] (III) and 0,9% NaCl (IV). Tissues were stained with hematoxylin/eosin and sectioned 5m μ m, sized 50 times.

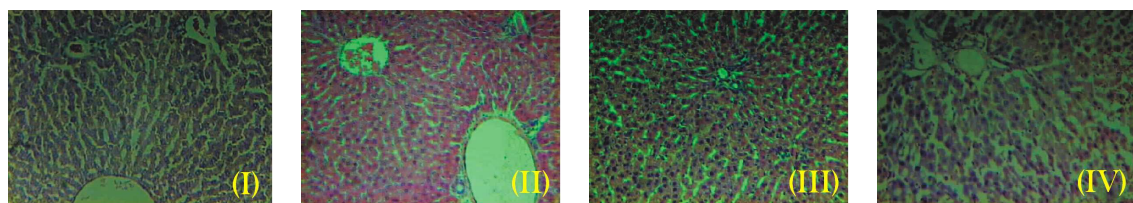


Fig. 2: Hepatic parenchyma of rats, after oral administration of 20 ml/kg Melxi® (I), bromelain [15 mg/ml] (II), bromelain [500 mg/ml] (III) and 0,9% NaCl (IV). Tissues were stained with hematoxylin/eosin and sectioned 5m μ m, sized 50 times.

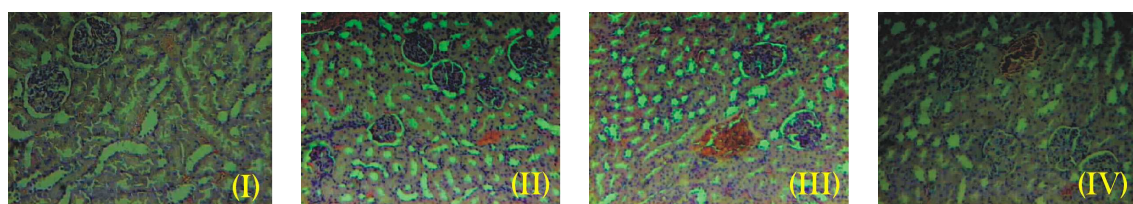


Fig. 3: Renal cortex of rats, after 20 ml/kg oral administration of Melxi® (I), bromelain [15 mg/ml] (II), bromelain [500 mg/ml] (III) and 0,9% NaCl (IV). Tissues were stained with hematoxylin/eosin and sectioned 5m μ m, sized 50 times.

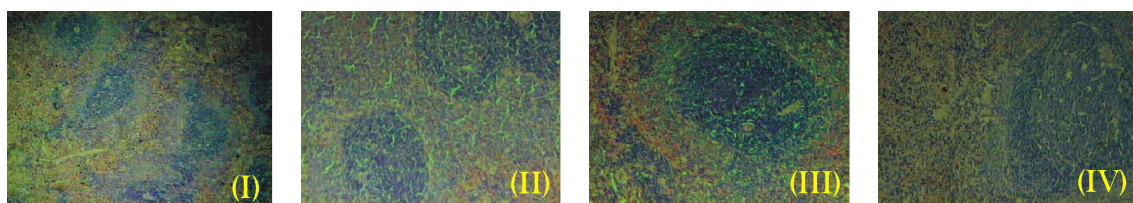


Fig. 4: Splenic parenchyma of rats, after 20 ml/kg oral administration of Melxi® (I), bromelain [15 mg/ml] (II), bromelain [500 mg/ml] (III) and 0,9% NaCl (IV). Tissues were stained with hematoxylin/eosin and sectioned 5m μ m, sized 50 times.

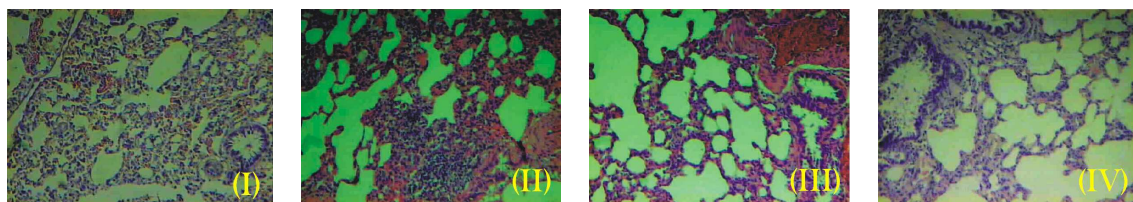


Fig. 5: Pulmonary parenchyma of rats, after 20 ml/kg oral administration of Melxi® (I), bromelain [15 mg/ml] (II), bromelain [500 mg/ml] (III) and 0,9% NaCl (IV). Tissues were stained with hematoxylin/eosin and sectioned 5m μ m, sized 50 times.

Conclusions

In summary, our results and these studies showed that bromelain may have an important paper in the therapeutics, as medicine with low cost, natural source, oral administration and a wide range of clinical applications with low toxicity.

Acknowledgements

This work was supported from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Laboratório HEBRON, S.A.

References

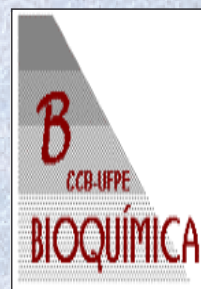
- [1] H. R. Maurer. *Cell. Mol. Life Sci.* 2002, *58*, 1234-45.
- [2] A. D Rowan. and D. J. Buttle, *Meth. Enzymol*, 1994, *244*, 555-68.
- [3] T. Hung, Y. Chang, H. Sung, and C. Chang. *J. Agric. Food Chem.* 2002, *50*, 4666-73.
- [4] G. Renzini and M. Varengo, *M. Arzneimittel-Forscher*, 1972, *2*, 410-412.
- [5] S. Tinozzi and A. Venegoni. *Drug Experimental Clininical Research*, 1978, *1*, 39-44.
- [6] A. Friesen, A. Schilling, A. Gofstetter and D Adam. *Z. Antimikrobian Antineoplastik Chirurgie*, 1987, *2*, 61-65.
- [7] I. N. Moss, C. V. Frazier and G.J. Martin. *Archives of International Pharmacodynamics*, 1963, *145*, 166-89.
- [8] J.K. Brown & M.H. Malone. *Constituents, activity, toxicology, and herbal folklore. Clin Toxicol.*, 1978; *12(1):1-31*.
- [9] J.V. Castell, G. Friedrich; C.S. Kuhn and G.E. Poppe. *American Journal of Physiology*, 1997, *273*, p. G139-46.
- [10] C. Kolac, P. Streichhan and C. M. Lehr. *European Journal of Pharmacology*, 1996, *42*, 222-32.
- [11] A. Maurer, F. Donath, I. Mai and I. Roots. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 1996, *50*, 548.
- [12] I. Mai, F. Donath, A. Maurer, S. Bauer and I. Roots. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 1996, *50*, 548.
- [13] F. Donath, I. Roots, I. Mai, A. Maurer, G. R. Wood, C. S. Kuhun and G. Friedrich. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 1997, *52*, *Suppl. A*, 146, *Res.* 453.
- [14] L. P. Hale. *International Immunopharmacology*, 2004, *4*, 255-64. [14] T. L. Mynott, B. Crossett, B. and S. R. Prathalingam. *Infection Immunology*, 2002, *70*, 86-95.
- [15] J. F. Poschet, K. Zouabi and P. D. Fairclough. *Gut*, 1999, *44*, *Suppl. 1*, 64A.
- [16] D. S. Chandler and T. L. Mynott. *Gut*, 1998, *43*, 196-202.
- [17] S. Kane and M. J. Goldberg. *Annals of Internal Medicine*, 2000, *132*, 680.
- [18] M. King and B. K. Rubin. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, *54*, 1475-90.
- [19] M. Majima, N. Kawashima, I. Hiroshi, M. Katori. *Effects of an orally active non-peptide bradykinin B2 receptor antagonist, FR173657, on plasma exudation in rat carrageenin-induced pleurisy. Br J Pharmacol*, 1997; *121*:723-30.

- [20] M. Majima, K. Nishiyama, Y. Iguchi, K. Yao, M. Ogino, T. Ohno, et al.
Determination of bradykinin-(1– 5) in inflammatory exudates by a new ELISA as a reliable indicator of bradykinin generation. *Inflamm Res*, 1996;45:416– 23.
- [21] M. Ogino, M. Majima, M. Kawamura, K. Hatanaka, M. Saito, Y. Harada, et al.
Increased migration of neutrophils to granulocyte-colony stimulating factor in rat carrageenin-induced pleurisy: roles of complement, bradykinin, and inducible cyclooxygenase-2. *Inflamm Res*, 1996; 45:335–46.
- [22] Z. Gaciong, L. Paczek, K. Bojakowski, K. Socha, M. Wisniewski, A. Heidland.
Beneficial effect of proteases on allograft arteriosclerosis in a rat aortic model. *Nephrol Dial Transplant*, 1996; 11:987– 9.
- [23] O.S. Targoni, M. Tary-Lehmann, P.V. Lehmann. Prevention of murine EAE by oral hydrolytic enzyme treatment. *J Autoimmun*, 1999; 12:191–8.
- [24] S.M. Thornhill, A.M. Kelly. Natural treatment of perennial allergic rhinitis. *Altern Med Rev*, 2000; 5:448– 54.
- [25] A. Wittenborg, P.R. Bock, J. Hanisch, R. Saller, B. Schneider. Comparative epidemiological study in patients with rheumatic diseases illustrated in a example of a treatment with non-steroidal anti-inflammatory drugs versus an oral enzyme combination preparation. *Arzneimittel-Forschung*, 2000; 50:728– 38.
- [26] A.C. Brown. Lupus erythematosus and nutrition: a review of the literature. *J Ren Nutr*, 2000; 10:170–83.
- [27] M. Masson. Bromelain in blunt injuries of the locomotor system. A study of observed applications in general practice. *Fortschr Med*, 1995; 113:303– 6.

ANEXOS



Effect of Bromelain after Oral Administration of Large Doses in Rats



Cândido, A.¹; Pontes, N. T.¹; Santos, B. S. dos²; Pimentel, M.C.B.¹ and Lima-Filho, J.L.¹ (*)

(1) Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA) –

(2) Laboratório de Química e metabolismo de Lipídeos e Lipoproteínas – Dep. de Bioquímica

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

(*) jose_luiz60@terra.com.br

ABSTRACT

'Crude bromelain', the aqueous extract from pineapples contains a mixture of different proteins, carbohydrates and other components. Cystein proteinases in crude bromelain are called *bromelains*. Studies declare for bromelains therapeutic benefits, such as treatment of inflammation, blood-coagulation-related, malignant diseases, infectious/inflammatory colitis. In order to evaluate the toxicity, large dosages of bromelain in oral administration were used in rats. Pathogen-free *Wistar* female rats aged approximately 8 weeks received orally by gastric gavage bromelain 300 mg/kg, bromelain 10 g/kg and NaCl 0.9% 20 ml/kg (control). After 24 hours, the rats were sacrificed. Lungs, stomach, liver, spleen and kidneys were stained with hematoxylin and eosin for morphological study. Our results demonstrated no macroscopic or microscopic morphological alterations in gastric, hepatic, renal, splenic and pulmonary tissues. These results claim for bromelain a paper in oral therapy for a wide range of applications with low toxicity.

Introduction

'Crude bromelain' is an aqueous extract from the stems and fruits of pineapples (*Ananas comosus*) and it contains a mixture of different proteins, carbohydrates and other components¹. Bromelain has a complex set of enzymes^{2,3}. The cystein proteinases found in bromelain are stem bromelain (EC 3.4.22.32), comosain, ananain (EC 3.4.22.31) and fruit bromelain (EC 3.4.22.33)¹.

In vitro and *in vivo* studies claim for bromelains a wide range of therapeutic benefits, such as treatment of inflammatory, blood-coagulation-related and malignant diseases¹. It has been also reported that bromelain enhances the tissue permeability of penicillins and tetracyclines⁴⁻⁶.

Although lethal doses have been reported by Moss⁷ in 1963, there is still little data that document the toxicity bromelain. The purpose of this study was to evaluate the oral toxicity of bromelain.

Materials and methods

Pathogen-free *Wistar* female rats aged approximately 8 weeks were obtained from Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, three groups, each comprising 10 animals, were studied. The rats received orally by gastric gavage the studied substances, Group A: bromelain 300 mg/kg, group B: bromelain 10 g/kg and group C (control): NaCl 0.9% 20 ml/kg. Doses were fractionated in four applications, each 4 hours. Animals were housed in autoclaved cages on autoclaved bedding in an air-conditioned room on 12-h light/12-h dark cycle. Irradiated food and acidified water were provided *ad libitum* throughout. All experimental procedures complied with the requirements of the Animal Care and Ethics Committee of the Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco.

After 24 hours of first oral administration, the rats were anesthetized by intra peritoneal (i.p.) injection of 0.5 ml of 5 mg/ml sodium pentobarbital and sacrificed by cardiac puncture exsanguination. Lungs, stomach, liver, spleen and kidneys surgically obtained were fixed with 10% phosphate-buffered formalin then embedded in paraffin and sectioned 5 µm. Tissue sections were stained with hematoxylin and eosin for morphological study.

Results and Discussions

No behavioral alterations were observed in animals during this study. Gastric, hepatic, splenic, renal and pulmonary tissues from the bromelain treated animals showed no alterations and were comparable to control group tissues (Figure 1). Table 2 summarizes the experimental results. In spite of gastric inactivation, former studies reported that bromelain has been documented in plasma after oral intake by different methodologies⁸⁻¹². Recently, bromelain was detected serum and stools of mice after oral administration in biologically significant levels of enzymatic activity, particularly using formulations containing antacid¹³. These results deny the traditional idea that proteins are totally inactivated in gastrointestinal tract.

Bromelain inhibits intestinal secretion caused by *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* enterotoxins¹⁴ and *Salmonella typhimurium* invasion in human macrophage-like cells¹⁵. It also protected piglets from diarrhea caused by K88+ enterotoxigenic *Escherichia coli*¹⁶ and promoted remission of ulcerative colitis that was refractory to conventional treatments in two patients¹⁷. These results claim for bromelain a paper in the treatment of gastrointestinal inflammatory diseases.

Bromelain has also an important mucolytic activity. Its natural source advocates a low toxicity, especially when compared with the traditional mucolytic agents¹⁸.

Reviews have signed for bromelain a paper in the therapeutic as antiinflammatory, antitrombotic immunomodulator and antineoplastic agent¹.

Conclusions

In summary, our results and these studies showed that bromelain may have an important paper in the therapeutics, as medicine with low cost, natural source, oral administration and a wide range of clinical applications with low toxicity.

Acknowledgements

This work was supported from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Laboratório HEBRON, S.A.

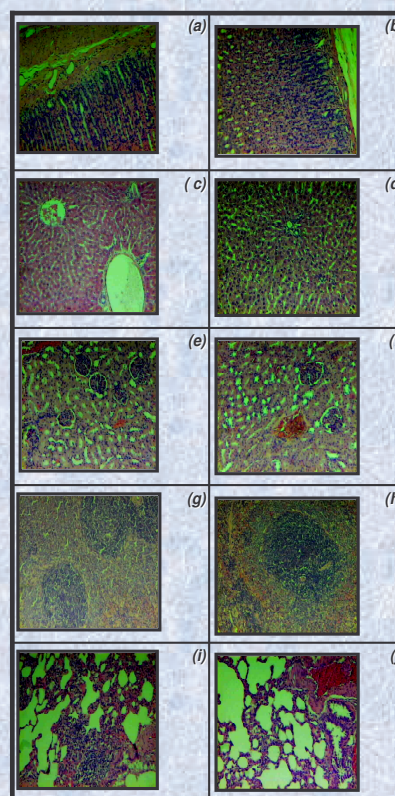


Fig. 1 - Studied Tissues from gastric corpus, groups A (a) and B (b); hepatic parenchyma, group A (c) and group B (d); renal cortex, group A (e) and group B (f); splenic parenchyma, group A (g) and group B (h); pulmonary parenchyma, group A (i) and group B (j). Hematoxylin & eosin, x 50.

References

- [1] H. R. Maurer, *Cell. Mol. Life Sci.* 2002, 58, 1234-45.
- [2] A. D. Rowan and D. J. Buttle, *Math. Enzymol.* 1994, 244, 555-68.
- [3] T. Hung, Y. Chang, H. Sung, and C. Chang, *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 4666-73.
- [4] G. R. Harris and M. V. Vargha, *M. Arzandeh-Panahy*, 1972, 2, 419-422.
- [5] S. Tiroz and A. Vengou, *Drug Experimental Clinical Research*, 1978, 1, 39-44.
- [6] A. Friesen, A. Schilling, A. Goldstetter and D. Adam, *Z. Antimikrobian Antineoplastik* 1987, 2, 61-65.
- [7] L. N. Moss, C. V. Frasier and G. J. Martin, *Archives of International Pharmacodynamics*, 1963, 145, 166-89.
- [8] J. V. Cassel, O. Friedrich, C. S. Kuhn and G. E. Poppe, *American Journal of Physiology*, 1997, 273, p. G139-46.
- [9] C. Kolac, P. Strechman and C. M. Lev, *European Journal of Pharmacology*, 1996, 42, 225-232.
- [10] A. Maurer, F. Donath, L. Mai and I. Roots, *European Journal of Clinical Pharmacology*, 1996, 50, 548.
- [11] L. Mai, F. Donath, A. Maurer, S. Bauer and I. Roots, *European Journal of Clinical Pharmacology*, 1996, 50, 548.
- [12] F. Donath, I. Roots, L. Mai, A. Maurer, G. R. Wood, C. S. Kuhn and G. Friedrich, *European Journal of Clinical Pharmacology*, 1997, 52, Suppl. A 146, Res. 463.
- [13] L. P. Hale, *International Immunopharmacology*, 2004, 4, 255-64 [14] T. L. Mynott, B. Craswell, B. and S. R. Pruthi, *Infection Immunology*, 2002, 70, 86-85.
- [15] J. F. Proulx, K. Z. Zou and P. D. Farnsworth, *Quint.* 1998, 44, Suppl. 1, 64A.
- [16] D. S. Chandler and T. L. Mynott, *Quint.* 1998, 44, 196-202.
- [17] S. Kane and M. J. Goldberg, *Annals of Internal Medicine*, 2000, 132, 680.
- [18] M. King and B. K. Rubin, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, 54, 1475-90.



Effect of Melxi® after Oral Administration of Large Doses in Rats



Cândido, A.¹; Pontes, N. T.¹; Leite, A. C. R.²; Pimentel, M.C.B.¹ and Lima-Filho, J.L.^{1*}

(1) Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA) –

(2) Laboratório de Química e metabolismo de Lipídeos e Lipoproteínas – Dep. de Bioquímica

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

(*) jose_luiz60@terra.com.br

ABSTRACT

Melxi® is commercially available from HEBRON Laboratories and contains approximately 15 mg/ml of bromelain in bee honey and it has as main indication the mucolytic action. Bromelain hydrolyzes peptide bonds and reduces the disulfide bond of mucus, reducing the elasticity and viscosity of mucus. In order to evaluate the toxicity, large dosages of Melxi® in oral administration were used in rats. Pathogen-free Wistar female rats aged approximately 8 weeks received orally by gastric gavage Melxi® 20 ml/kg and NaCl 0.9% 20 ml/kg (control). After 24 hours, the rats were sacrificed. Lungs, stomach, liver, spleen and kidneys were stained with hematoxylin and eosin for morphological study. Our results demonstrated no macroscopic or microscopic morphological alterations in studied tissues. These results suggest for Melxi® a paper in oral therapy with low toxicity.

Introduction

Melxi® is commercially available from HEBRON Laboratories and contains approximately 15 mg/ml of bromelain in bee honey and it has as main indication the mucolytic action. Bromelain hydrolyzes peptide bonds and reduces the disulfide bond (S-S) to a sulphydryl bond (-SH) of mucin, thus reducing the elasticity and viscosity of mucus¹.

In vitro and *in vivo* studies claim for bromelains a wide range of therapeutic benefits, such as treatment of inflammatory, blood-coagulation-related and malignant diseases^{1,2}. It has been also reported that bromelain enhances the tissue permeability of penicillins and tetracyclines³⁻⁵.

Although lethal doses of bromelain have been reported by Moss⁶ in 1963, there is still no data that document the toxicity of oral Melxi®. The purpose of this study was to evaluate the oral toxicity of Melxi®.

Materials and methods

Pathogen-free Wistar female rats aged approximately 8 weeks were obtained from Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco. Two groups, each comprising 10 animals, were studied. The rats received orally by gastric gavage Melxi® 20 ml/kg (Group A) and NaCl 0.9% 20 ml/kg (group B, control).

Animals were housed in autoclaved cages on autoclaved bedding in an air-conditioned room on a 12-h light:12-h dark cycle. Irradiated food and acidified water were provided *ad libitum* throughout. All experimental procedures complied with the requirements of the Animal Care and Ethics Committee of the Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco.

After 24 hours of first oral administration, the rats were anesthetized by intra peritoneal (i.p.) injection of 0.5 ml of 5 mg/ml sodium pentobarbital and sacrificed by cardiac puncture exsanguination. Lungs, stomach, liver, spleen and kidneys surgically obtained were fixed with 10% phosphate-buffered formalin then embedded in paraffin and sectioned 5 µm. Tissue sections were stained with hematoxylin and eosin for morphological study.

Results and Discussions

No behavioral alterations were observed in animals during this study. Gastric, hepatic, splenic, renal and pulmonary tissues from the Melxi® treated animals showed no alterations and were comparable to control group tissues (Figure 1).

Former studies reported that bromelain has been documented in plasma after oral intake by different methodologies⁷⁻¹¹. Recently, bromelain was detected serum and stools of mice after oral administration in biologically significant levels of enzymatic activity¹². These results deny the traditional idea that proteins are totally inactivated in gastrointestinal tract.

Bromelain inhibited intestinal secretion caused by *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* enterotoxins¹³ and *Salmonella typhimurium* invasion in human macrophage-like cells¹⁴. It also protected piglets from diarrhea caused by K88+ enterotoxigenic *Escherichia coli*¹⁵ and promoted remission of ulcerative colitis that was refractory to traditional treatments in two patients after oral administration¹⁶. These results claim for bromelain a paper in the treatment of gastrointestinal inflammatory diseases.

Melxi® is routinely prescribed by physicians as a mucolytic agent. Its is prepared with honey bee and bromelain, this natural source advocates a low toxicity, especially when compared with the traditional mucolytic agents¹⁷.

Reviews have signed for bromelain a paper in the therapeutic as anti-inflammatory, antitrombotic immunomodulator and antineoplastic agent¹.

In summary, our results and these studies show that bromelain may have an important paper in the therapeutics, as medicine with low cost, natural source, oral administration and a wide range of clinical applications with low toxicity.

Acknowledgements

This work was supported from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Laboratório HEBRON, S.A.

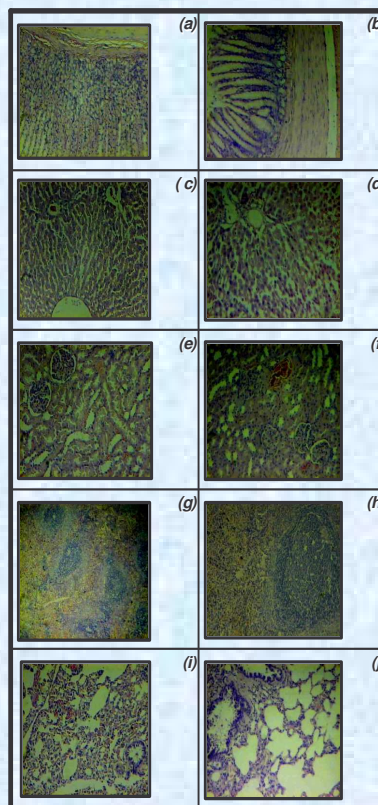


Fig. 1 - Studied Tissues from gastric corpus, group A (a) and B (b); hepatic parenchyma, group A (c) and B (d); renal cortex, group A (e) and B (f); splenic parenchyma, group A (g) and B (h); pulmonary parenchyma, group A (i) and B (j). Hematoxylin & eosin, x 50.

References

- [1] H. R. Maurer. *Cell. Mol. Life Sci.* 2002; 58: 1234-45.
- [2] A. D. Rowley and D. J. Butte. *Meth. Enzymol.* 1994; 244: 555-68.
- [3] T. Hung, Y. Chang, H. Sung, and C. Chang. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 4698-73.
- [4] S. Tinoco and A. Venegoni. *Drug Experimental Clinical Research*, 1978; 1: 39-44.
- [5] A. Friesen, A. Schilling, A. Goldsletter and D. Adam. *Z. Antimicrob. Antineoplastik Chem.* 1987; 2: 61-65.
- [6] L. N. Moss, C. V. Fraser and G. J. Martin. *Archives of International Pharmacodynamics*, 1963; 145: 165-69.
- [7] J. V. Costelli, G. Friedlich, C. S. Kuhn and G. E. Poppe. *American Journal of Physiology*, 1997; 273: p. G139-46.
- [8] C. Kdoe, P. Streichman and C. M. Lehr. *European Journal of Pharmacology*, 1996; 42: 229-32, 1998.
- [9] A. Maurer, F. Doreth, I. Ma and I. Rods. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 1996; 50: 548.
- [10] I. Ma, F. Doreth, A. Maurer, S. Bauer and I. Rods. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 1996; 50: 548.
- [11] F. Doreth, I. Rods, I. Ma, A. Maurer, G. R. Wood, C. S. Kuhn and G. Friedlich. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 1997; 52: Suppl. A 146: Res. 493.
- [12] L. P. Hale. *International Immunopharmacology*, 2001; 4: 255-64 [14] T. L. Myrnest, B. Grossett, B. and S. R. Pratherigan. *Infection Immunology*, 2002; 70: 86-95.
- [13] T. L. Myrnest, B. Grossett, B. and S. R. Pratherigan. *Infection Immunology*, 2002; 70: 86-95.
- [14] J. F. Paschet, K. Zouabi and P. D. Fieldough. *Out.*, 1999; 44: Suppl. 1: 64A.
- [15] D. S. Chandler and T. L. Myrnest. *Out.*, 1998; 43: 195-202.
- [16] S. Kane and M. J. Goldberg. *Annals of Internal Medicine*, 2000; 132: 680.
- [17] M. King and B. K. Rubin. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002; 54: 1475-90.

BROMELINA BIOQUÍMICA E USOS CLINICOS

Cândido, A.¹; Santos, B. S. dos²; Silva, R. A.¹, Pimentel, M.C.B.¹; Lima-Filho, J.L.^{1 (*)}

(1) Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA)

(2) Laboratório de Química e Metabolismo de Lipídeos e Lipoproteínas – Dep. de Bioquímica
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

(*) jose_luiz60@terra.com.br

Bromelain – Biochemistry and Clinical Applications

Introdução

O extrato de proteínas obtido a partir dos vegetais da família *bromeliaceae*, cujo membro mais conhecido é o abacaxi, é conhecido genericamente como **BROMELINA** e pode ser obtido do fruto, folhas e talo. Este extrato bruto possui diferentes proteínas destacando-se as peptidases e os inibidores de proteinases¹.

A bromelina tem diversos usos, todos baseados em sua atividade proteolítica. Na indústria tem sido aplicada no amaciamento de carnes, clarificação de cervejas, fabricação de queijos, preparo de alimentos infantis e dietéticos, no pré-tratamento de soja, no amaciamento do couro e na indústria têxtil no tratamento da lã e da seda².

O uso medicinal do abacaxi é conhecido desde os tempos dos indígenas americanos nativos, de acordo com os relatos de Thévet (1558): “ *the fruit of which the natives of America make the greatest medicinal use is called nana* (ananas) “ ou de Rochefort (1605) : ” (o suco do abacaxi) *admirably recreates and exhilarates the Spirits and comfort the Heart; it also fortifies the Stomach, cureth queasiness and causeth Appetite; it gives present ease to such as*

are troubled with the stone or stoppage of Urine; ‘nay it destroys the force of Poyson’”³.

A bromelina, manufaturada em 1956 no Havaí, desde então, inúmeros trabalhos científicos descrevem diversas atividades farmacológicas da bromelina, demonstrando efeitos antiinflamatórios, antitrombóticos, trombolíticos, imunomoduladores, mucolíticos, antitumorais e no debridamento de tecidos necrosados⁴

Bioquímica e Farmacodinâmica

O extrato bruto da bromelina possui diferentes enzimas. 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 kD⁵. A bromelina hidroliza ligações peptídicas em resíduos de alanil, glicil e leucil em substratos diversos, desde tripeptídeos cromogênicos até proteínas de alto peso molecular. Esta ação ocorre sobre proteínas solúveis e estruturais de membrana, como receptores e marcadores de superfície^{1,4}. A bromelina possui ainda atividade tiol-redutase, promovendo a redução de pontes dissulfeto entre cadeias peptídicas¹.

Após a ingestão oral, a bromelina sofre a ação proteolítica do suco gástrico, sendo inativada em sua maioria. Relatos demonstram que parte da bromelina é absorvida e pode ser detectada no plasma por técnicas de marcação isotópica⁶, detecção imune e atividade enzimática⁷. A diminuição da inativação pelo suco gástrico pode ser obtida com a preparação de formulações de liberação entérica⁷ ou por associação com antiácidos, permitindo que a bromelina atravessasse intacta todo o trato gastrointestinal, sendo detectada em fezes de camundongos⁸.

No plasma, a bromelina complexa-se aos inibidores de proteases alfa-2-macroglobulina ($\alpha 2M$) e alfa-1-antiquimiotripsina, sendo depois fagocitado por células “scavenger”, principalmente no fígado e metabolizados por proteases lisossômicas⁹.

Ações Farmacológicas

A bromelina demonstrou eficácia em prevenir o edema provocado por carragenina e dextrana¹⁰ e apresentou maior atividade que indometacina, AAS e oxifenbutazona na prevenção do edema induzido¹¹.

Estudos diversos demonstraram que a bromelina diminui a secreção por células imunes de mediadores inflamatórios¹² e apresentou eficácia em pleurisia induzida por carragenina¹³, aterosclerose em enxerto alogênico em ratos¹⁴, doenças reumatológicas humanas¹⁵, encefalomielite alérgica experimental, um modelo para esclerose múltipla humana¹⁶ e rinite alérgica IgE-mediada¹⁷.

A bromelina aumenta a absorção de antibióticos quando administrados em associação por via oral, reduzindo a morbimortalidade em doenças

infecciosas¹⁸ e aumenta a absorção oral e intramuscular de penicilina, amoxicilina e tetraciclina¹⁹.

A administração de bromelina ativa o plaminogênio à plasmina, que cliva a fibrina, diminuindo a agregação plaquetária²⁰.

Estudos relataram que a bromelina melhorou a sobrevida em pacientes com câncer²¹, inibiu o crescimento de diversas linhagens tumorais *in vitro* e diminui a invasibilidade tumoral e metástases em modelos animais²².

A bromelina estimulou células monocíticas a produzir elevadas quantidades de fator de necrose tumoral alfa e interleucinas *in vitro*²³, importantes mediadores na ativação dos leucócitos e na inibição do crescimento de células tumorais. Outros relatos descrevem a remoção de marcadores de superfície celular em leucócitos, alterando a adesão celular, importante na regulação das células imunes^{4,8}.

O uso de bromelina em queimaduras experimentais demonstrou debridamento completo em período menor, em comparação ao uso de collagenase, sem comprometimento dos tecidos não desvitalizados²⁴.

A bromelina demonstrou *in vitro* capacidade de inibir a secreção de toxinas pelo *Vibrio cholerae* e *Escherichia coli*²⁵ e bloqueou a invasão dos macrófagos por *Salmonella typhimurium*²⁶. Em modelo animal, a bromelina promoveu alterações proteolíticas nos receptores k88 de enterócitos de leitões, impedindo a adesão de *E. coli* k88+ enteropatogênica, prevenindo a enteroinfecção na maioria dos animais²⁷. Em humanos, a administração oral de bromelina promoveu a remissão dos

sintomas em pacientes com retocolite ulcerativa²⁸.

A bromelina demonstrou capacidade de diminuir a viscosidade de secreções mucosas respiratórias, através de sua atividade proteolítica e tiol-redutase, promovendo a quebra de ligações peptídicas e pontes dissulfeto da rede de mucina²⁹.

Toxicidade

Estudos pré-clínicos demonstraram a segurança da administração oral de bromelina, mesmo em doses altas como 12 g/dia em humanos⁷. A DL₅₀ da bromelina foi determinada em roedores correspondendo a 37 e 85 mg/kg para via intraperitoneal e 30 e 20 mg/kg para via intravenosa, para camundongos e ratos, respectivamente. Doses elevadas como 10g/kg não foram suficientes para alcançar a DL₅₀ por via oral³⁰.

4. Discussão e conclusões

Podemos listar como seguintes os argumentos para o uso clínico da bromelina: (i) a bromelina pertence a um grupo de enzimas proteolíticas com diversas aplicações clínicas comprovadas, (ii) a bromelina é um agente fitoterápico, com poucos efeitos tóxicos, (iii) a bromelina é absorvida por via oral com efeito sistêmico comprovado, facilitando sua administração.

Referencias Bibliográficas

- [1] **H.R. Maurer, 2001.** Cellular and Molecular Life Sciences. **58**. 1234-45.
- [2] **R.A. Silva, K.A. Moreira, P.G. Cadena, A.L.F. Porto, A.C. Silva, J.L. Lima Filho, M.C.B. Pimentel** in Anais do XXXIII Congresso Brasileiro da SBBq, Caxambu, 2004.
- [3] **S.J. Taussig, and S. Batkin,** Journal of Ethnopharmacology. 1988, **22**, 191-203.
- [4] **L.P. HALE, P.K. E. GRRER, G.D. SEMPOWSKI,** Clinical Immunology, 2002, **104**, 183-90.
- [5] **T. Harrach, K. Eckert, H. R. Maurer.** Journal of Protein Chemistry. 1978, **17**, 351-61.
- [6] **J. Seifert, R. Ganser, W. Brendel.** Z. Gastroenterology. 1979, **17**, 1-8.
- [7] **J.V. Castell, G. Friedrich, C.S. Kuhn, G.E. Poppe.** American Journal of Physiology, 1997, **273**, G139-46.
- [8] **L.P. Hale.** International Immunopharmacology. 2004, **4**, 255-264.
- [9] **C.T. Chu, T.D. Oury, J.J. Enghild, Pizzo, S.V.** Journal of Immunology. 1994, **152**, 1538-45.
- [10] **C. Netti, G. L. Bandi, A. Pecile.** Illustrated Pharmacology. 1972, **8**, 453-66.
- [11] **G. Uhlig, I. Seifert.** Fortscritte der Medizin. 1981, **15**, 554-6.
- [12] **T.L. Mynott, B. Crossett, Prathalingam.** Infection Immunology. 2002, **70**, 86- 95.
- [13] **M. Majima, N. Kawashima, I. Hiroshi, M. Katori.** British Journal of Pharmacology. 1997, **121**, 723-30.
- [14] **Z. Gaciong, L. Paczek, K. Bojakowski, K. Socha, M. Wisniewski, A. Heidland.** Ephrology Dial Transplant. 1996, **11**, 987-9.

- [15] **A. C. Brown.** Journal of Renal Nutrition. 2000, *10*, 170–83.
- [16] **O. S. Targoni, M. Tary-Lehmann, P.V. Lehmann.** Journal of Autoimmunology. 1999, *12*, 191–8.
- [17] **S. M. Thornhill, A.M. Kelly.** Alternative Medicine Reviews. 2000, *5*, 448–54.
- [18] **R.A. Neubauer.** Experimental Medicine and Surgery. 1961, *19*, 143-60.
- [19] **A. Friesen, A. Schilling, A. Gofstetter, D. Adam. Z.** Antimikrobien Antineoplastik Chirurgie 1987, *2*, 61-5.
- [20] **C. Metzger, E. Grabowska, K. Eckert, K. Rehse, H. R. Maurer.** In vivo. 1999, *13*, 7-12.
- [21] **H. A. Nieper.** Krebsgeschehen. 1976, *1*, 9-15.
- [22] **E. Grabowska, K. Eckert, I. Fichtner, K. Schulze-Forster, H. R. Maurer.** International Journal of Oncology. 1997, *11*, 243-8.
- [23] **L. Desser, A. Rehberger, W. Paukovistis.** Cancer Biotherapy. 1994, *9*, 253-63.
- [24] **N. W. Ahle, M. P. Hamlet.** Annals of Emergency Medicine. 1987, *16*, 1063-65.
- [25] **T. L. Mynott, S. Guandalini, F. Raimondi.** Gastroenterology. 1997, *113*, 175-84.
- [26] **J. F. Poschet, K. Zouabi, P. D. Fairclough.** Gut. 1999, *44*, Supl.1, Resumo 64A.
- [27] **D. S. Chandler, T. L. Mynott.** Gut. 1998, *43*, 196-202.
- [28] **S. Kane, M. J. Goldberg.** Annals of Internal Medicine. 2000, *132*, 680.
- [29] **M. King, B. K. Rubin.** Advanced Drug Delivery Reviews. 2002, *54*, 1475-90.
- [30] **I. N. Moss, C. V. Frazier, G.J. Martin.** Archives of International Pharmacodynamics. 1963, *145*, 166-89.

