UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DANIEL RIOS PINHO

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ASSOCIAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO COM BROMELINA

Feira de Santana, BA

2023

DANIEL RIOS PINHO

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ASSOCIAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO COM BROMELINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

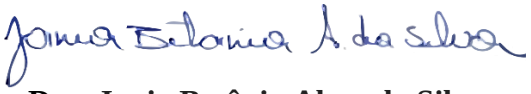
Orientadora: Profa. Dra. Sandra Aparecida de Assis.

Coorientador: Prof. Dr. Edrian Mania.

Feira de Santana, BA

2023

BANCA EXAMINADORA



Dra. Jania Betânia Alves da Silva

(Universidade Federal do Recôncavo da Bahia)

Dr. Ernando Silva Ferreira
(Universidade Estadual de Feira de Santana)

Dra. Sandra Aparecida de Assis Rodowanski(Universidade Estadual de Feira de Santana) Orientadora e Presidente da Banca

Feira de Santana – BA

2023

Ficha catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado - UEFS

Pinho, Daniel Rios
P723s Síntese, caracterização e associação de nanopartículas de ouro com Bromelina / Daniel Rios Pinho. – 2023.
51f. : il.

Orientadora: Sandra Aparecida de Assis
Coorientador: Edrian Mania
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Feira de Santana. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2023.

1. Nanotecnologia. 2. Proteases. 3. Cicratização. 4. Bromelina. I. Assis, Sandra Aparecida de, orient. II. Mania, Edrian, coorient. III. Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Título.

CDU: 582.564:577.15

Rejane Maria Rosa Ribeiro CRB-5/695

Aos meus pais, Geovânio e Anailda, que sempre me proporcionaram um porto seguro onde eu pudesse desenvolver meus estudos com paciência, cuidado e dedicação.

AGRADECIMENTOS

A minha família, pelo apoio e por serem minha base sólida.

Aos amigos, pelas palavras de conforto.

A Profª. Dra. Sandra, pela oportunidade na orientação, e por ter me ensinado muito a respeito da enzimologia.

Ao Prof. Dr. Edrian, pelos valiosos ensinamentos, e por ser o responsável por me fazer gostar da nanotecnologia.

As colegas do LAEN, em especial a Thaíse e Sara, pela paciência e por terem me ajudado nesse processo.

Ao colega Yuri, no LABOFIS, pela parceria e apoio durante as sínteses de nanopartículas.

Ao Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da UFBA e ao LAMUME do Instituto de Física pelas análises de microscopia eletrônica e pelas leituras das amostras no Zetasizer.

A Universidade Estadual de Feira de Santana.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Nada é tão nosso como os nossos sonhos.

Friedrich Nietzsche

RESUMO

O extrato do caule e dos frutos verdes oriundos de vegetais da família Bromeliaceae (principalmente o abacaxi - *Ananas comosus*) contém um conjunto de enzimas proteolíticas conhecidas genericamente como Bromelina, a qual, são atribuídas diversas atividades farmacológicas, como a ação cicatrizante e anti-inflamatória, que podem ser aprimoradas com o auxílio de nanomateriais. A nanotecnologia dispõe de diversas formas de utilização no ramo farmacêutico, incluindo o uso de nanopartículas que atuam como veículos para distribuição de compostos derivados. Esse estudo teve por objetivos realizar levantamento teórico a respeito da enzima bromelina e de nanopartículas de ouro (AuNPs), utilizando deste para iniciar uma pesquisa prática de síntese e caracterização de nanopartículas de ouro associadas com a enzima bromelina. As nanopartículas produzidas apresentaram uma estabilidade moderada de -27,8 mV, tamanho médio de 47,6 nm e índice de polidispersão de 0,391. Após a associação, atingiram valores de -12 mV, 1,24 μm e 0,536, respectivamente. A microscopia mostrou que as nanopartículas produzidas foram esféricas e apresentaram um diâmetro real de 20 nm após a associação. Nas nanopartículas de ouro, a bromelina foi associada em cerca de 77%, com atividade enzimática de 23,36 U/mL, confirmando a atividade após adsorção. Em comparação com a literatura científica, os dados obtidos sugerem que o complexo formado por nanopartículas de ouro e bromelina podem ser aplicados em filmes curativos, através de novos estudos.

Palavras-chave: Protease. Bromelina. Nanotecnologia. Cicatrização.

ABSTRACT

The extract of the stem and green fruits from vegetables of the Bromeliaceae family (mainly pineapple - Ananas comosus) contains a set of proteolytic enzymes known generically as Bromelain, which are attributed with various pharmacological activities, such as healing and anti-inflammatory action. , which can be improved with the help of nanomaterials. Nanotechnology has several forms of use in the pharmaceutical sector, including the use of nanoparticles that act as vehicles for the distribution of derived compounds. This study aimed to carry out a theoretical survey regarding the bromelain enzyme and gold nanoparticles (AuNPs), using this to begin practical research on the synthesis and characterization of gold nanoparticles associated with the bromelain enzyme. The nanoparticles produced showed a moderate stability of -27.8 mV, an average size of 47.6 nm and a polydispersity index of 0.391. After association, they reached values of -12 mV, 1.24 μm and 0.536, respectively. Microscopy showed that the nanoparticles produced were spherical and had an actual diameter of 20 nm after association. In the gold nanoparticles, bromelain was associated in approximately 77%, with an enzymatic activity of 23.36 U/mL, confirming the activity after adsorption. In comparison with the scientific literature, the data obtained suggests that the complex formed by gold nanoparticles and bromelain can be applied in healing films, through new studies.

Keywords: Protease. Bromelain. Nanotechnology. Healing.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 1. A- Abacaxi obtido para a pesquisa. O inset exibe as folhas do abacaxizeiro, que também são acompanhadas por bromelina, presente no extrato em detalhe. B- Solução coloidal avermelhada de nanopartículas de ouro ao fim da reação. 43

Figura 2. Leitura de espectrofotometria mostrando comparativo do comprimento de onda das AuNps antes (linha preta) e após (linha vermelha) a associação com bromelina. 44

Figura 3. A- Imagem de microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas associadas na escala de 100 nm. O inset mostra os planos cristalinos de átomos de nanopartículas de ouro na escala de 5 nm. B- Padrão de difração de elétrons de área selecionada da distribuição de nanopartículas. C- Histograma de distribuição de tamanho de nanopartículas de ouro associadas à bromelina. D- Espectro de emissão de raios-X determinado por espectroscopia de energia dispersiva. 45

Figura 4. Curva padrão de albumina de soro bovino usada como curva de calibração. 47

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Média do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas isoladas e associadas. 46

Tabela 2. Teor de proteína, atividade proteolítica e atividade específica da bromelina das folhas do abacaxi e do sobrenadante da associação. 47

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AE – Atividade específica

Au – Ouro

AuNPs – Nanopartículas de ouro

AuNRs – Nanobastões de ouro

BCN – Nanocelulose bacteriana

BICS – Síndrome de compartimento induzida por queimadura

CAGR – Taxa de crescimento anual composta

CS – Quitosana

DGD – Agente de gel desbridante à base de bromelina (Debrase)

FDA – Food and Drug Administration

HAuCl4 – Ácido tetracloroáurico

IL 1; IL-2; IL-6 – Interleucinas

INF-g – Interferon gama

IR – Infravermelho

MEC – Matriz extracelular

MMPs – Metaloproteinases da matriz

NK – Células natural killer

NMNPs – Nanopartículas de metais nobres

NPs – Nanopartículas

NXB – NexoBrid

PBMCs – Células mononucleares do sangue periférico

PCL – Policaprolactona

PDA – Polidopamina

PEG – Polietilenoglicol

PZ – Potencial Zeta

SC – Citrato de sódio

SRP – Ressonância plasmônica de superfície

TIA – Ataque isquêmico transitório

TIMPs – Inibidores teciduais de metaloproteinase

TNFα – Fator de necrose tumoral

UA/min – Atividade proteolítica por minuto

UFBA – Universidade Federal da Bahia

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO GERAL	13
	CAPÍTULO 1 – O COMPLEXO BROMELINA ADSORVIDO EM NANOPARTÍCULAS DE OURO NO PROCESSO CICATRICIAL	14
1	A LESÃO TECIDUAL E O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO	15
2	A CLASSE DAS PROTEASES	16
3	O COMPLEXO ENZIMÁTICO BROMELINA	16
3.1	O ABACAXI COMO FONTE DE BROMELINA	16
3.2	A BROMELINA E SUAS APLICAÇÕES FARMACOLÓGICAS	18
3.3	ESTUDOS DE APLICAÇÕES FARMACOLÓGICAS DA BROMELINA	19
3.4	FORMULAÇÕES CURATIVAS CONTENDO BROMELINA ASSOCIADA	21
4	ESTUDOS COM OUTRAS PROTEASES	23
5	NANOTECNOLOGIA APLICADA A NANOPARTÍCULAS DE OURO	25
5.1	A NANOTECNOLOGIA E O ESTUDO DE NANOPARTÍCULAS	25
5.2	NANOPARTÍCULAS DE OURO	26
	REFERÊNCIAS	30
	CAPÍTULO 2 – SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ASSOCIAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO COM BROMELINA	36
	RESUMO	37
	ABSTRACT	37
1	INTRODUÇÃO	38
2	MATERIAIS E MÉTODOS	39
2.1	MATERIAIS	39
2.2	SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS	40
2.3	OBTENÇÃO DO EXTRATO DE BROMELINA	40
2.4	PURIFICAÇÃO DA ENZIMA E ADSORÇÃO EM NANOPARTÍCULAS DE OURO	41
2.5	CURVA PADRÃO DE PROTEÍNA E EFICIÊNCIA DA ASSOCIAÇÃO	41
2.6	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	41
2.7	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS ADSORVIDAS	42
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
3.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO	42
3.1.1	SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO E ASSOCIAÇÃO COM BROMELINA	42
3.1.2	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO	43
3.2	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA, EFICIÊNCIA DE ASSOCIAÇÃO E ATIVIDADE ENZIMÁTICA	46
4	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	49

INTRODUÇÃO GERAL

O processo de desenvolvimento de novos fármacos é um trabalho, geralmente, longo, oneroso, mas que se traduz, muitas vezes, em sucesso após o lançamento do medicamento no mercado, trazendo benefícios tanto do ponto de vista social, no tratamento, diagnóstico e profilaxia de enfermidades, como do ponto de vista econômico. A pesquisa e desenvolvimento de novas formulações visa driblar dificuldades e limitações de fórmulas existentes e/ou novas, a fim de garantir a maior estabilidade do produto, maior eficácia terapêutica, comodidade posológica, menos efeitos adversos, etc.

A bromelina é um complexo enzimático que apresenta ação proteolítica, obtida a partir de plantas da família *Bromeliaceae* e, tem sido amplamente estudada, devido às suas ações farmacológicas descritas: redução da agregação plaquetária, tratamento de tromboflebite, efeito cardioprotetor (LEY et al, 2011), antidiarreica, potenciação de antibiótico, ação antimicrobiana, antineoplásica, auxílio na digestão, doença inflamatória intestinal, esclerose múltipla, injúrias músculo-esqueléticas, osteoartrite, prostatite, doenças renais e respiratórias, artrite reumatoide, cirurgia, e desbridamento de feridas (MONOGRAPH, 2010).

As nanopartículas (NPs) desempenham um papel importante no diagnóstico e tratamento de doenças devido a maior razão área/volume. (QASIM et al. 2014, AKBARI et al. 2017). Em particular, as nanopartículas de ouro (AuNPs) têm alta biocompatibilidade e propriedades ópticas, eletrônicas e catalíticas únicas. Constituem uma plataforma ideal para ajustar as propriedades de proteínas bioativas, como enzimas. Os estudos sobre o uso de nanopartículas associadas a proteínas vêm aumentando exponencialmente, pois esses sistemas são capazes de melhorar a estabilidade e protegê-los contra a desnaturação da digestão enzimática, reduzir a toxicidade, além de aumentar a solubilidade e permeabilidade (BRITO et al., 2021).

O propósito deste trabalho foi promover o carreamento do complexo enzimático bromelina em nanopartículas de ouro para serem usados posteriormente em trabalhos de preparação de filmes curativos e utilização em processos cicatriciais. Para isto, as enzimas obtidas foram incorporadas nos nanocarreadores de ouro, e estes, caracterizados. O intuito desse processo é avaliar a atividade da enzima bromelina associada a nanopartículas de ouro.

CAPÍTULO 1

O COMPLEXO BROMELINA ADSORVIDO EM NANOPARTÍCULAS DE OURO NO PROCESSO CICATRICIAL

1 A LESÃO TECIDUAL E O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO

Para Marchesini & Ribeiro (2020), denomina-se lesão tecidual da pele quando há perda da integridade do órgão ou ruptura do tecido, podendo ocorrer o comprometimento da epiderme, derme e até de tecidos mais profundos. Podem ser classificadas como agudas ou crônicas. As agudas normalmente cicatrizam dentro do tempo previsível, conforme os estágios do processo de cicatrização. Já as lesões crônicas, são mais complexas, não evoluem de acordo com as fases de cicatrização e em geral possuem um longo período para reparo e, frequentemente, são relacionadas às comorbidades.

Martelli et al. (2016) ressalta que o mecanismo de cicatrização é um complexo processo biológico que envolve eventos celulares e moleculares para a reconstituição de tecidos lesionados. Este processo surge como resposta do tecido a lesões induzidas por trauma ou por procedimentos cirúrgicos, sendo caracterizado por três fases que se sobrepõem e apresentam características especificas: fase inflamatória, fase proliferativa e fase de remodelação.

Durante a fase inflamatória ocorrem hemostasia, migração leucocitária e o início da cascata de reparação tecidual. A fase proliferativa se caracteriza por fibroplasia, angiogênese e reepitelização. Na fase de remodelação, o colágeno é o principal componente da derme, sendo que nesta etapa ocorre a mudança do tipo de colágeno que a compõe onde a disposição do colágeno tipo III é inicialmente mais abundante que o tipo I e ao longo deste processo, este vai sendo degradado ativamente enquanto o colágeno I vai tendo sua produção aumentada pelos fibroblastos (MARTELLI; ANDRADE; SANTOS, 2018).

A fase de remodelação de uma ferida é regulada por proteases, cuja conformação e atividade coordenada dependem de fatores locais, como o pH e a colonização bacteriana do local da ferida. As metaloproteinases da matriz (MMPs) são reguladas positivamente pela mTOR e inibidas pelos inibidores teciduais de metaloproteinase (TIMPs) e pela α1-quimotripsina. Destaca-se a importância das MMPs na degradação dos componentes da matriz provisória e dos TIMPs no equilíbrio entre degradação e síntese (LAUREANO & RODRIGUES, 2011). Pristo (2012) relata que as MMPs são essenciais para o colágeno e para esta fase de remodelagem, e que a deficiência de minerais como o magnésio e o zinco pode acarretar a diminuição da síntese de proteínas envolvidas no processo cicatricial.

2 A CLASSE DAS PROTEASES

Enzimas são moléculas biológicas complexas responsáveis por catalisar milhares de processos metabólicos nos seres vivos. Nesse conjunto, as proteases são responsáveis por quebrar as ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas e representam um dos grupos de enzimas mais relevantes produzidas industrialmente (SILVA et al., 2014).

As enzimas proteases são utilizadas em diversas aplicações, principalmente nas indústrias de detergentes, alimentícia e farmacêutica. As proteases representam mais de 60% da participação no mercado de enzimas, possuindo uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) esperada de 5,3% do ano de 2014 a 2019 (FEIJOO SIOTA & VILLA, 2011; KUMAR et al., 2014).

As proteases são divididas em cinco grupos com base no mecanismo de ação no sítio ativo (cisteína, serino, aspártico, metalo e grupos não classificados de peptidases). Proteases de cisteína compõem uma grande classe de enzimas de fontes vegetais, animais e bacterianas, e desempenham um papel importante em vários processos biológicos (BORELLI et al., 2011).

Proteases e seus inibidores contribuem para o equilíbrio entre a degradação e a deposição da matriz extracelular (MEC), criando um equilíbrio essencial para a cicatrização oportuna e coordenada de feridas cutâneas. Quando esse equilíbrio é interrompido, as feridas são levadas a um estado de cronicidade caracterizado por níveis abundantes de proteases e níveis diminuídos de inibidores de protease (MCCARTY & PERCIVAL, 2013).

As proteases de cisteína estão presentes em todos os organismos vivos. Várias enzimas foram purificadas parcial ou completamente para aplicações terapêuticas, biotecnológicas e industriais, e as enzimas proteolíticas são amplamente utilizadas para esses fins. A papaína foi a primeira cisteína protease isolada e caracterizada. As proteases de cisteína estão presentes também no complexo enzimático derivado do abacaxi conhecido como bromelina (BRITO et al., 2021).

3 O COMPLEXO ENZIMÁTICO BROMELINA

3.1 O ABACAXI COMO FONTE DE BROMELINA

O abacaxi [*Ananas comosus (L.) Merr*] pertence à família *Bromeliaceae*. É uma das frutas comerciais mais importantes do mundo, sendo a terceira fruta tropical mais importante do mundo,

depois da banana e dos cítricos. Esta fruta é altamente perecível e sazonal. A fruta madura contém 14% de açúcar; uma enzima de digestão de proteínas (bromelina) e uma boa quantidade de ácido cítrico, ácido málico, vitamina A e B. Tailândia, Filipinas, Brasil e China são os principais produtores de abacaxi do mundo, fornecendo quase 50% da produção total (HOSSAIN; AKHTAR; ANWAR, 2015).

De acordo com Vasconcelos et al. (2013), *Bromeliaceae* é considerada a segunda maior família de monocotiledôneas epífitas, e possui aproximadamente 57 gêneros e mais de 3.000 espécies de plantas. O abacaxi é o principal componente da família *Bromeliaceae* e possui grande importância econômica devido a presença da enzima bromelina em sua composição, muito empregada nas indústrias alimentícia e farmacêutica (OLIVEIRA & ALMEIDA, 2012).

De acordo com muitos pesquisadores, o abacaxi é originário de países da América do Sul, como Colômbia, Brasil e Paraguai, sendo exportado para outros lugares por meio de viajantes e historiadores que divulgaram informações sobre o abacaxi, principalmente portugueses e espanhóis (COLLINS, 1960; PURSEGLOVE, 1975). No século 16, o abacaxi já havia chegado a muitas partes do mundo. A dispersão do abacaxi pelo mundo é resultado de suas qualidades de sobrevivência características em termos de diferentes condições ambientais e secas, e também da forma como ele produz propágulos com facilidade em ambientes subcultivados (COLLINS, 1960; MORTON & DOWLING, 1987; PURSEGLOVE, 1975).

O abacaxi possui fruto múltiplo comestível constituído de bagas coalescidas, sendo a planta economicamente mais significativa da família *Bromeliaceae.* Pode ser cultivado a partir do corte da copa do fruto, possivelmente florescendo em cinco a dez meses e frutificando nos seis meses seguintes. O abacaxi é uma fonte rica em muitos nutrientes vegetais reconhecidos como componentes importantes da dieta, mas também pode ser usado para tratar e prevenir uma série de doenças, incluindo a doença cardíaca coronária, obesidade, hipercalcemia, diabetes tipo 2, hipertensão, catarata, doenças oculares e gastrointestinais (NASSR & ABU-NASER, 2018).

No Brasil, o abacaxi, constitui um dos principais produtos da fruticultura nacional. Apesar da abundância do cultivo dessa fruta, o aproveitamento industrial ainda é pequeno frente ao consumo da fruta “in natura”, sendo necessária a busca de alternativas para o seu uso, visando o aproveitamento do excesso de safras, principalmente pela indústria, para a fabricação de produtos não tradicionais (SILVA et al., 2010).

A utilização de frações vegetais normalmente desprezadas, como cascas, talos e folhas, agregando-lhes valor econômico, ambiental e nutricional, por apresentarem quantidades significativas de fibras alimentares e outros componentes, é interessante para a fruticultura, necessitando de investigação científica e tecnológica que possibilite sua utilização de forma eficiente, econômica e segura (SOUSA et al., 2011).

Os frutos do abacaxi contêm muitos elementos principais e secundários. É fonte de compostos bioativos, principalmente em enzimas proteolíticas. O abacaxi é uma fonte muito rica em bromelina e outras proteases de cisteína que estão presentes em diferentes partes da fruta (ASIM et al., 2015).

3.2 A BROMELINA E SUAS APLICAÇÕES FARMACOLÓGICAS

Entende-se por bromelina como sendo um nome coletivo para enzimas proteolíticas ou proteases que são encontradas nos tecidos, no caule, nas folhas e no fruto do abacaxi e em outras espécies de plantas da família *Bromeliaceae* (RAMLI et al., 2018; ROJAS et al., 2018). A bromelina foi identificada no final do século XIX. A sua potência terapêutica foi revelada em 1957 quando pela primeira vez se descobriu que o abacaxi era uma das suas principais fontes. A composição enzimática varia entre as partes do fruto. O fruto é amplamente utilizado como fonte de alimento, portanto, a principal fonte de extração da bromelina é o caule do abacaxi, sendo mais barata por ser a parte não comestível da planta (HEINICKE & GORTNER, 1957).

A bromelina de resíduos de abacaxi como caroços, cascas e folhas são encontradas em quantidades relativamente menores em comparação com caules e frutos. A bromelina do caule (EC 3.4.22.32) e a bromelina do fruto (EC 3.4.22.33) obtidas do caule e da polpa do abacaxi estão disponíveis comercialmente (KETNAWA; CHAIWUT; RAWDKUEN, 2011).

Os efeitos benéficos da bromelina são resultantes de seus múltiplos constituintes. Formada principalmente por enzimas proteolíticas contendo sulfidrila, a bromelina também contém escarase (um componente não proteolítico com efeitos de desbridamento), peroxidase, fosfatase ácida, glucosidases, celulases, vários inibidores de protease, glicoproteínas, carboidratos e cálcio organicamente ligados (AMINI et al., 2013). A bromelina é composta por 212 aminoácidos e o peso molecular é de 33 kDa. É estável em pH 3,0 - 6,5 e uma vez combinada com seu substrato, a atividade não é mais suscetível ao efeito do pH. A faixa de temperatura efetiva é de 40 °C - 65 °C com a ótima sendo 50 °C - 60 °C (GAUTAM et al., 2010).

A Food and Drug Administration (FDA) (2006), classificou a bromelina como um aditivo alimentar e está entre as substâncias que são geralmente aceitas como seguras. Tem sido utilizada na indústria; para amaciar carnes, em processos de panificação, na produção de hidrolisados de proteína, clarificação de cerveja e suco de maçã, como suplemento alimentar. Além de ser utilizada também na indústria cosmética e indústrias de couro (BALA et al, 2012).

No ramo farmacêutico, a bromelina é muito utilizada para tratamento de várias doenças como angina, indigestão e problemas respiratórios (LEITE et al., 2012). A atividade proteolítica da bromelina possibilita que a mesma seja empregada para vários fins, sendo utilizada em aplicações terapêuticas em animais, possui efeitos antimetastáticos, além de atuar em alergias, processos imunológicos e inflamações (BRESOLIN et al., 2013). Os efeitos colaterais são raros, de modo que é, além disso, aplicada em oncologia, odontologia e em uma ampla variedade de lesões esportivas (AICHELE et al., 2013).

3.3 ESTUDOS DE APLICAÇÕES FARMACOLÓGICAS DA BROMELINA

Peixoto et al. (2016), afirmam que a atividade anti-inflamatória da bromelina resulta, em parte, da inibição da formação de bradicinina no local da inflamação, bem como da redução de intermediários da cascata da coagulação, o que limita a formação de fibrina. A bromelina reduz a migração leucocitária, bem como a expressão de moléculas de adesão (CD128) aos vasos sanguíneos. Além disso, a bromelina auxilia na ativação de células natural killer (NK), no aumento da produção de fator de necrose tumoral alfa, bem como de Interferon gama (INF-g), de várias interleucinas (IL 1, IL-2, IL-6) e do fator estimulador de crescimento de colônia de granulócitos e macrófagos e parece poder interromper a ativação contínua de linfócitos $CD4^{+}$ mantenedores do processo inflamatório.

Müller et al. (2013), em um ensaio clínico randomizado controlado por placebo, administraram bromelina via oral em voluntários, a fim de avaliar atividades imunomoduladoras em baixa e alta dose. Foi notado que houve modulação na resposta de linfócitos, expressando o efeito anti-inflamatório conhecido. Mesmo após uma única dose oral de bromelina, mudanças na resposta de células imunes estimuladas foram encontradas, demonstrando que a enzima é capaz de alcançar a circulação sanguínea em uma forma biologicamente ativa, ou estimulando o epitélio intestinal que, por sua vez, poderia então mudar as atividades de células próximas do sistema imunológico da mucosa do intestino.

De acordo com Borelli et al. (2011), a bromelina demonstrou ter efeitos inibitórios na motilidade intestinal de camundongos mediada por diferentes agentes espasmogênicos, agindo na secreção intestinal e inflamação do local. Estes resultados obtidos podem colocar a bromelina como uma matéria ativa no desenvolvimento de novas drogas, que podem agir na estabilidade do trânsito intestinal durante uma inflamação e na diabetes.

Aichele et al. (2013), notaram que após um estudo sobre miofibroblastos na cicatrização de feridas in vitro, *a* aplicação de bromelina para prevenir cicatrizes extremas durante a cicatrização de feridas por queimadura, mostrou-se um processo muito promissor.

Pillai et al. (2014) observaram que a bromelina induziu a apoptose celular e autofagia em tecidos de mesotelioma peritoneal maligno, atuando dessa forma como um agente anticâncer. Foi testada também a associação da bromelina com a cisplatina e com o 5-fluoracil. A associação aumentou a citotoxicidade da cisplatina, porém, não houve alteração na conjugação com o 5-fluoracil.

Amini et al. (2013), investigaram os efeitos citotóxicos da bromelina em linhas celulares de carcinoma gastrointestinal humano, e chegaram a conclusão de que esta inibiu a proliferação de células cancerosas do tecido gastrointestinal. A bromelina não só pareceu ativar as vias apoptóticas dependentes de caspase e a apoptose de p53 independente da transcrição, como também induziu a inibição concomitante da sobrevivência celular.

Dhandayuthapani et al. (2012) revelaram que a bromelina pode induzir apoptose em células de câncer de mama por meio da ativação de uma via dependente de caspase. Há evidências de que, em condições in vitro, a bromelina pode inibir o crescimento de uma variedade de células cancerosas, incluindo células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231, células de carcinoma escamoso KB, e células de melanoma SK-MEL-28. Além disso, a bromelina mostrou induzir a diferenciação de células leucêmicas que eventualmente resultou nas células em apoptose. Fouz et al. (2013), também realizaram estudos sobre câncer de mama, investigando bromelina comercial e recombinante, e descobriram que estas são eficazes, não tóxicas e seguras como alternativa terapêutica ao tratamento desse tipo de câncer. As bromelinas comerciais e recombinantes afetam a citocinética das células MCF-7, diminuindo a viabilidade celular, demonstrando força semelhante ao taxol, um medicamento anticancerígeno altamente tóxico.

Segundo Pavan et al., (2012), a bromelina previne ou minimiza a gravidade da angina peitoral e ataque isquêmico transitório (TIA). É útil na prevenção e tratamento da tromboflebite. Pode quebrar placas de colesterol e exercer uma atividade fibrinolítica potente. Tem sido eficaz no tratamento de doenças cardiovasculares, pois é um inibidor da agregação plaquetária, minimizando assim o risco de doenças arteriais trombose e embolia. Uma combinação de bromelina e outros nutrientes protegem contra lesão de isquemia / reperfusão no músculo esquelético.

A bromelina tem sido recomendada como uma abordagem terapêutica adjuvante no tratamento de doenças inflamatórias crônicas, malignas e doenças autoimunes. Experimentos in vitro mostraram que a bromelina tem a capacidade de modular moléculas de adesão de superfície em células T, macrófagos, células natural killer, e também induzir a secreção de IL-1β, IL-6 e fator de necrose tumoral α (TNFα) por células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).

Tratamento de células com bromelina diminuem a ativação de células T CD4(+) e reduzem a expressão de CD25. Além disso, há evidências de que a terapia oral com bromelina produz certos efeitos analgésicos e anti-inflamatórios em pacientes com artrite reumatoide (PAVAN et al., 2012).

Dave et al. (2012) perceberam em seu estudo que a bromelina do caule pode inibir irreversivelmente a diferenciação de adipócitos 3T3-L1 ao reduzir a expressão do gene adipogênico e que induz apoptose e lipólise em adipócitos maduros. Os diversos efeitos da bromelina do caule parecem depender de sua capacidade incomum de atravessar as membranas e de sua aceitabilidade como uma enzima administrada por via oral com efeitos colaterais mínimos. Além disso, esse tipo de enzima está sendo usada de forma eficaz como uma pílula antiobesidade (França Vita Natura Pvt Ltd.).

Domingues et al. (2013) avaliaram em uma raça de ovinos a atividade do abacaxi (*Ananas comosus*) in vitro e *in vivo* sobre o parasita *Haemonchus contortus* e notaram que tanto o extrato aquoso quanto a bromelina foram eficazes in vitro, mas mostraram avaliação reduzida dos efeitos no extrato aquoso da casca de abacaxi, bromelina e resíduo de processamento de abacaxi em *H. contortus* nas ovelhas infectadas artificialmente.

3.4 FORMULAÇÕES CURATIVAS CONTENDO BROMELINA ASSOCIADA

Algumas biomoléculas podem ser utilizadas para acelerar o processo de reparo tecidual, entre elas a bromelina, que possui aplicações clínicas e terapêuticas importantes, podendo ser usadas em processos de cicatrização e desbridamento seletivo de queimaduras, além de possuir atividades anti-inflamatória e fibrinolítica (LIMA et al., 2019).

Hu et al. (2011), revelaram em um estudo sobre o efeito de desbridamento da bromelina em ferimentos por arma de fogo em porcos que a solução de bromelina (10 mg / mL) promoveu a hidrólise do tecido desvitalizado de forma eficiente com o mínimo de danos ao tecido normal, favorecendo uma diminuição no sangramento e inchaço do local da ferida. Wu et al. (2012) posteriormente propuseram uma nova terapia que demonstrou encurtar o tempo de cicatrização de feridas causadas por arma de fogo de alta velocidade em comparação com ferimentos simples de incisão da ferida, indicando que a bromelina tópica provavelmente tem um papel fundamental na cura de danos aos tecidos causados por armas de fogo, promovendo um efeito positivo no microambiente da ferida para reparação de tecidos.

Krieger et al. (2017) avaliaram que um tipo de formulação de bromelina de uso tópico, chamado de Debrase (NexoBrid), que foi utilizado para desbridamento enzimático de queimaduras

em braços, diminuiu o número de pacientes com queimaduras extensas, além de reduzir a necessidade de enxertos de pele no local da lesão. Rosenberg et al. (2012), também estudaram o agente de gel desbridante à base de bromelina (DGD), também conhecido como Debrase, a fim de observar os efeitos da DGD na derme normal, queimada e mecanicamente exposta da pele suína. Ao fim, concluíram que a DGD não tem efeito digestivo aparente na derme viável não queimada e na pele normal, apoiando ainda mais sua seletividade como agente desbridante enzimático, agindo especificamente na escara.

NexoBrid (NXB), anteriormente conhecido como Curativo de Gel de Desbridamento (DGD, Debridase ou Debrase), é um medicamento órfão de desbridamento enzimático derivado do grupo de enzimas Bromelina do Abacaxi. O NXB parece fornecer uma alternativa adicional ao exigente tratamento da mão queimada. Uma ferramenta de desbridamento não cirúrgica segura que oferece remoção precoce de escara de queimadura, libera (ou previne) síndrome de compartimento induzida por queimadura (BICS) com maior preservação da derme nativa e/ou tecido subcutâneo sobre as intrincadas estruturas tendíneas e vasculares, que pode fornecer uma modalidade minimamente invasiva para o cuidado de mãos profundamente queimadas (KRIEGER et al., 2017).

Schulz et al. (2018) estudaram o efeito do desbridamento enzimático à base de bromelina nas células da pele utilizando o NexoBrid (NX). Os ensaios clínicos existentes mostram que o tecido viável não é danificado no nível macroscópico pelo NX, porém, o efeito no nível celular ainda não era bem conhecido. Com o estudo dessa atividade a nível microscópica, foi observado que tanto os queratinócitos quanto os fibroblastos foram danificados pelo NX, mesmo em baixas concentrações. Os macrófagos pareceram resistir ao tratamento com NX de forma mais eficiente do que os outros tipos de células. No ensaio clínico, a atividade NX no fluido da ferida diminuiu claramente após 4 horas de desbridamento enzimático. As respostas inflamatórias das células vitais na própria queimadura provavelmente inibem a atividade do NX.

Membranas de nanocelulose bacteriana (BCN) foram capazes de absorver e liberar bromelina seletivamente. A própria bromelina apresenta atividades antimicrobiana e antioxidante, porém, após incorporada às membranas do BNC, sua atividade antimicrobiana foi aumentada. A ampla solução de bromelina e o espectro antimicrobiano da membrana BNC e sua adesão ao tecido os tornam um método alternativo para o controle da contaminação de feridas, uma vez que a membrana pode atuar como plataforma de liberação do antimicrobiano, evitando gradativamente a formação de biofilme. Portanto, a membrana BNC contendo bromelina provou ser um sistema de entrega de drogas promissor para minimizar o período de cicatrização, reduzindo o risco de infecção e promovendo o conforto do paciente e o alívio da dor (ATAIDE et al., 2017).

Costa et al. (2020) utilizaram fibras de celulose do bagaço de cana contendo bromelina imobilizada para aplicação em curativo. Os melhores resultados de imobilização da enzima

bromelina nas fibras foram obtidos com o agente ativador aminopropiltrietoxissilano e glutaraldeído em pH 7 com valores em termos de proteínas totais de 68,97% e atividade de 88,14%. A eficiência da imobilização depende de vários parâmetros como propriedades das enzimas, suportes, método de imobilização, entre outros. Porém, estudos prévios e atuais de imobilização indicaram a adequação do uso de diferentes agentes ativadores para imobilização de bromelina em fibras de bagaço de cana-de-açúcar.

O uso de polidopamina (PDA) para imobilizar a bromelina em fibras de policaprolactona (PCL) eletrofiadas resultou na produção de membranas curativas altamente eficazes. A atividade da bromelina foi marcadamente estabilizada através do processo de imobilização, e as fibras resultantes, chamadas de BrPDA-PCL, foram capazes de suportar a adesão e proliferação celular. Dada a sinergia observada entre o PDA e a bromelina, essas fibras de BrPDA-PCL também exibiram atividade antibacteriana. Quando utilizado em um modelo animal, a inflamação foi reduzida e as taxas de cicatrização melhoraram em ratos tratados com fibras de BrPDA-PCL em relação aos controles não tratados (CHEN et al., 2020).

4 ESTUDOS COM OUTRAS PROTEASES

A papaína é uma mistura complexa de enzimas proteolíticas e peroxidases, que provém do látex do mamoeiro (*Carica papaya)*, encontrado comumente, dentre outros locais, no Brasil. No ramo farmacêutico, a papaína é produzida tanto nas apresentações tópicas (creme, gel, pó e spray) para afecções de pele, quanto em formulações orais para auxiliar nas funções digestivas. Além do seu uso como desbridante, a papaína possui ação anti-inflamatória, agindo na contração e junção de bordos de feridas de cicatrização por segunda intenção, podendo ser utilizada com diferentes concentrações nas diversas fases de cicatrização, de acordo com o tipo de tecido da ferida. A enzima ainda reduz o pH do leito da ferida, estimulando a produção de citocinas que promovem o processo de reprodução celular e tornam o meio desfavorável ao crescimento de patógenos (LEITE et al., 2012).

Freitas et al. (2017) pesquisaram a atividade da fração proteolítica (P1G10) do fruto *Vasconcellea cundinamarcensis*, em modelo de excisão de ferida cutânea, e após experimentos em animais, descobriram que essa fração do látex de *V. cundinamarcensis* demonstrou acelerar a cicatrização da pele em modelos de dermoabrasão e de queimaduras induzidas por calor. Foi notado também que em modelos com etiologias diferentes, a aplicação tópica de P1G10 foi eficaz e melhorou a taxa de cicatrização.

Nunes (2018) em um estudo pré-clínico e clínico piloto, avaliou o efeito de uma biomembrana de proteínas do látex de *Calotropis procera* (AIT.) na cicatrização. A biomembrana em questão se tratava do BioMem CpLp, que possui atividade proteolítica com presença de compostos, entre eles, algumas proteases cisteínicas. O tratamento inovador utilizando essa fração CpLb proveniente do látex da matéria prima foi benéfico no tratamento de úlceras plantares, reduzindo o tempo de cicatrização, além de promover o desbridamento do tecido desvitalizado, bem como o aumento do tecido reepitelizado.

Patry & Blanchette (2017), concluíram em revisão sistemática que há uma falta de ensaios clínicos randomizados de qualidade metodológica adequada sobre a colagenase como agente de desbridamento enzimático. No entanto, em conjunto, os dados revisados apoiam o uso de colagenase para úlceras de pressão e úlceras de pé diabético, além do uso da colagenase em conjunto com antibióticos tópicos em queimaduras quando o desbridamento enzimático é considerado necessário. A colagenase parece benéfica para a cicatrização de feridas e por sua capacidade de remover tecidos necróticos ou desvitalizados. Por outro lado, os pacientes tratados com colagenase podem apresentar um risco aumentado de eventos adversos em comparação com um tratamento alternativo.

Yariswamy et al. (2013) promoveram a aplicação tópica de serinoproteases da planta medicinal *Wrightia tinctoria (Apocyanaceae)* em feridas de excisão induzidas experimentalmente em camundongos, a fim de aumentar a cicatrização. Foi constatado no estudo que as serinoproteases termoestáveis do látex de *Wrightia tinctoria* estão diretamente envolvidas no processo de cicatrização de feridas. As descobertas fornecem a base bioquímica para o papel das proteases de látex de *Wrightia tinctoria (WTLP)* no aprimoramento da cicatrização de feridas, apoiando ainda a aplicação tópica tradicional do látex em feridas frescas para promover a cicatrização acelerada.

Gudmundsdóttir, Hilmarsson e Stefansson (2013) desenvolveram alguns estudos a respeito do potencial da tripsina de bacalhau do Atlântico *(Gadus morhua)* em áreas biomédicas, entre elas, na cicatrização de feridas. A tripsina do bacalhau do Atlântico demonstrou ser 3 a 12 vezes mais eficaz na degradação de grandes proteínas nativas do que seu análogo mesofílico, a tripsina bovina. Os resultados do estudo clínico mostraram que uma formulação específica de hidrogel contendo tripsina de bacalhau mostrou eficácia superior para a cicatrização de feridas por pressão em relação a outros métodos convencionais. Aparentemente, a alta capacidade digestiva da tripsina de bacalhau adaptada ao frio para grandes proteínas nativas desempenha um papel na sua eficácia contra patógenos e seus efeitos positivos em feridas.

5 NANOTECNOLOGIA APLICADA A NANOPARTÍCULAS DE OURO

5.1 A NANOTECNOLOGIA E O ESTUDO DE NANOPARTÍCULAS

A nanotecnologia pode ser definida como o controle e a compreensão da matéria em dimensões entre 1 e 100 nm, ou seja, em escala nanométrica, onde fenômenos únicos permitem novas aplicações. Embora a exposição humana a nanopartículas tenha ocorrido ao longo da história humana, ela aumentou dramaticamente durante a revolução industrial (HULLA; SAHU; HAYES, 2015).

O avanço na área da nanotecnologia e suas aplicações no campo de medicamentos e produtos farmacêuticos revolucionou o século XX. A nanotecnologia trata átomos, moléculas ou compostos individuais em estruturas para produzir materiais e dispositivos com propriedades especiais. Envolve o trabalho de cima para baixo, ou seja, reduzindo o tamanho de grandes estruturas para a menor estrutura, que envolve a mudança de átomos e moléculas individuais em nanoestruturas. Por trabalhar a matéria em dimensões na escala nanométrica de comprimento, a nanotecnologia pode ser usada para uma ampla gama de aplicações e na criação de vários tipos de nanomateriais e nanodispositivos (NIKALJE et al., 2015).

Os nanomateriais são de interesse em muitas áreas científicas, pois possuem importantes aplicações em uma ampla variedade de áreas. Eles já são usados em muitos produtos comercialmente disponíveis, como cosméticos e protetores solares, produtos farmacêuticos, equipamentos esportivos, curativos para cicatrização de feridas, entre outros. Possuem excelentes propriedades biológicas, o que os torna adequados para fins médicos. Podem interagir com proteínas e organelas celulares. Essas interações podem ser usadas para o desenvolvimento de novos materiais médicos e farmacêuticos (PIVODOVÁ et al., 2015). Por isso, nos últimos anos, o desenvolvimento de nanomateriais funcionais tem despertado grande atenção na nanomedicina. Diversos tipos de nanomateriais, como lipossomas, nanopartículas de sílica mesoporosa, nanopartículas metálicas, têm desempenhado um papel significativo na entrega de medicamentos, no tratamento do câncer e no diagnóstico de doenças (PAN et al., 2018).

As nanopartículas (NPs) exercem uma função importante no diagnóstico e tratamento de doenças devido às suas maiores áreas superficiais em comparação com o material a granel (QASIM et al. 2014, AKBARI et al. 2017). As propriedades das nanopartículas são inerentes ao tamanho, morfologia e distribuição que podem melhorar suas características ópticas, eletrônicas, magnéticas e catalíticas. Nanopartículas de metais nobres (NMNPs) exibem propriedades físicas, químicas e

biológicas únicas. NMNPs podem ser utilizados em microeletrônica, sensores químicos e bioquímicos, diagnósticos médicos e terapêuticos, catálise, imagens biológicas, células fotovoltaicas e bactericidas (LOPES et al., 2018).

No campo da cicatrização de feridas várias abordagens com nanopartículas foram desenvolvidas para acelerar o processo de recuperação tecidual, ativando diferentes fases de cicatrização. Nanopartículas metálicas, como prata, zinco e ouro, apresentam propriedades atrativas como baixa toxicidade in vivo e atividade antimicrobiana. As nanopartículas de prata, por exemplo, são amplamente utilizadas em curativos para tratar infecções (CATANZANO et al., 2017; FRANKOVA et al., 2016; KABA & EGOROVA, 2015).

Dentre esses materiais, uma das nanoestruturas mais estudadas são as nanopartículas de ouro (AuNPs) que receberam mais atenção devido às suas características ópticas atrativas, biocompatibilidade e química de superfície versátil para funcionalização biológica (PAN et al., 2018). Nanopartículas de ouro, particularmente nanopartículas não esféricas, como nanobastões de ouro (AuNRs) permitem várias aplicações de imagem, diagnóstico, sensoriamento e terapia, seja como conjugados de drogas ou independentemente, têm sido investigados para habilidades de cicatrização de feridas (MAHMOUD et al., 2019).

5.2 NANOPARTÍCULAS DE OURO

O ouro tem sido considerado como tendo propriedades valiosas há séculos. As nanopartículas de ouro atraíram atenção significativa na entrega de drogas direcionadas, diagnóstico de doenças e monitoramento de procedimentos cirúrgicos. No campo da nanomedicina, a entrega de drogas direcionadas tem sido o principal objetivo a ser alcançado e as nanopartículas de ouro desempenham um papel muito significativo para atingir esse objetivo, pois podem ser facilmente sintetizadas e funcionalizadas. Devido à superfície expansiva da proporção de volume de nanopartículas de ouro, um número adequado de moléculas de droga pode ser entregue por essas partículas (IRAM et al., 2019).

Em particular, as nanopartículas de ouro têm alta biocompatibilidade e propriedades ópticas, eletrônicas e catalíticas únicas. Portanto constituem uma plataforma ideal para ajustar as propriedades de proteínas bioativas, como enzimas. Atualmente, os estudos sobre o uso de nanopartículas associadas a proteínas vêm aumentando exponencialmente, pois esses sistemas são capazes de melhorar a estabilidade e protegê-los contra a desnaturação da digestão enzimática, além de aumentar a solubilidade e permeabilidade, além de reduzir a toxicidade (BRITO et al., 2021).

Nanomateriais nobres, como as nanopartículas de ouro, oferecem propriedades únicas, como a ressonância plasmônica de superfície, que pode ser utilizada para diferentes aplicações terapêuticas e de detecção. Várias AuNPs têm sido utilizadas para melhorar os curativos para o tratamento de feridas cutâneas (AL-KINANI; HAIDER; AL-MUSAWI, 2021) desenvolvendo uma cicatrização acelerada pela ativação de diferentes fases de cicatrização (MAHMOUD et al., 2019). No entanto, AuNPs podem induzir citotoxicidade durante a preparação e entrega in vivo. Como tal, seus potenciais efeitos adversos a longo prazo devem ser cuidadosamente considerados (PERNODET et al., 2006).

Pesquisas essenciais usando AuNPs de vários tamanhos e morfologias têm sido realizadas em aplicações biomédicas, como carreadores de drogas, marcadores de direcionamento de patógenos e tumores, agentes fototérmicos e intensificadores de dose de radioterapia devido às suas características únicas (KIM et al., 2015). As AuNPs Ganharam maior atração em aplicações antibacterianas, antioxidantes e cicatrizantes quando combinadas com fitoconstituintes naturais (ABDEL-RAOUF; AL-ENAZI; IBRAHEEM, 2017; BOOMI et al., 2019). Da mesma forma, alguns relatos indicam a eficácia das nanopartículas de ouro no diagnóstico e tratamento de certos tipos de câncer (LAZARUS E SINGH et al. 2016).

Uma questão-chave a ser resolvida antes que uma nanopartícula possa ser integrada em uma molécula biológica é a química de sua superfície, que determina sua estabilidade, funcionalidade e possíveis aplicações. Devido à forte reatividade superficial dos elétrons livres, as AuNPs não revestidas são sensíveis ao pH, temperatura, níveis de eletrólitos e solventes, e também tendem a agregar quando usadas em tais meios. Para resolver esse problema, várias AuNPs protegidas por ligantes foram sintetizadas. Espécies protetoras, como a quitosana, são normalmente adicionadas principalmente durante a síntese para obter coloides estáveis (AL-MUSAWI et al., 2020).

Existem algumas metodologias aplicadas na preparação de AuNPs. Dentre esses métodos está a técnica de redução química, considerada como um método eficiente para o preparo de nanopartículas, por conta de benefícios como o preparo altamente eficiente e a economia de tempo (ZAWRAH; EL-MOEZ; CENTER, 2011). As nanopartículas de ouro podem ser produzidas de forma eficiente pela redução química do ácido tetracloroáurico (HAuCl4) através de vários produtos químicos, como o citrato de sódio, borohidreto de sódio e ácido ascórbico (JIN et al., 2018; KAWDE et al., 2017).

A nanotecnologia promoveu uma revolução na biologia e na medicina, pois, as nanopartículas mostram vantagens especiais, como na utilização de sensores, aprimoramento de imagem e agentes de entrega. Existe uma variedade de nanopartículas relevantes que podem ser utilizadas no meio biomédico, entre elas estão as nanopartículas poliméricas, nanopartículas metálicas, micelas, dendrímeros, lipossomas, pontos quânticos e nanomontagens. Para a aplicação

de nanopartículas na medicina é imprescindível que as mesmas sejam biocompatíveis e capazes de serem funcionalizadas. Em relação às nanopartículas de ouro, sua funcionalização externa faz-se necessária para encaminhá-las para áreas específicas de doenças, permitindo que elas interajam de forma seletiva com biomoléculas ou células (DARAEE et al., 2016).

Para um biossensor ser baseado em nanopartículas de ouro é necessário que esta estrutura seja funcionalizada ou capeada com uma biomolécula tiolada, que, cause alteração na absorção ótica da nanopartícula logo após identificar uma biomolécula complementar (EBRAHIMNEZHAD et al. 2013). AuNPs funcionalizadas com agregado de antígeno (anticorpo), por exemplo, quando o anticorpo correspondente (antígeno) se liga ocorre uma mudança na banda de absorbância (DAVARAN et al. 2014, HOSSEININASAB et al. 2014). Em particular, as propriedades visuais das AuNPs são determinadas por sua ressonância plasmônica, que está associada à excitação combinada de elétrons de condução, estando localizada na região ampla, do visível ao infravermelho (IR), dependendo da forma da partícula, tamanho e estrutura (THIRUPPATHIRAJA et al. 2011).

As AuNPs têm sido usadas ativamente na identificação de agentes biológicos e químicos. Essas estruturas podem favorecer os métodos de visualização em microscopia óptica (WANG et al. 2010), em particular, microscopia confocal a laser, que ganhou popularidade crescente na área biomédica. Os métodos para obtenção de imagens confocais incluem dispersão de luz elástica de ressonância ou de dois fótons (multifóton) por nanopartículas de plasmon ou pela detecção de fluorescência. Esses métodos baseiam-se na detecção de micro-objetos por meio de um microscópio óptico em que a luminescência do objeto é excitada pela absorção simultânea de dois ou mais fótons; sendo a energia de cada um deles inferior à necessária para a excitação de fluorescência. A principal vantagem desta técnica é que a forte redução do sinal de fundo resulta no aumento do contraste da imagem (DARAEE et al., 2016).

As nanopartículas podem entrar facilmente nas células, embora os mecanismos envolvidos ainda não sejam bem compreendidos. A entrada ocorre por endocitose; as partículas são inseridas e ultrapassam a bicamada lipídica da membrana celular. Além disso, essas nanopartículas são capazes de entrar nas células mesmo após a ligação com proteínas. As nanopartículas conjugadas com anticorpos, por exemplo, têm sido usadas para se ligar especificamente a células cancerígenas contra os receptores exclusivos da superfície dessas células; as nanopartículas funcionalizadas com outras estruturas também foram usadas para entrada direcionada em células. Nanopartículas de ouro com um tamanho aproximado de 20 nm foram conjugadas com vários peptídeos específicos para fornecer nanopartículas funcionais que penetram na membrana biológica e atingem o núcleo. Várias nanopartículas também foram aplicadas como agentes de liberação de drogas para diagnóstico e tratamento médico do câncer, além de biomarcadores direcionados (DARAEE et al., 2016).

Os nanocompósitos de colágeno e ouro produziram resposta de cicatrização de feridas na pele de maneira dose-dependente (AKTURK et al. 2016). As nanopartículas de ouro exercem influência positiva na cicatrização de infecções de feridas por meio da terapia de fotobiomodulação (LAU et al. 2017). Além disso, foi relatado que o revestimento de nanopartículas de ouro fitoquimicamente estabilizado em uma membrana hidrocoloide tem efeitos significativos na cura de feridas cutâneas (KIM et al. 2015).

Um estudo foi realizado sobre a cultura de fibroblastos criopreservados juntamente com nanopartículas de ouro para o tratamento de queimaduras em ratos. Os efeitos antimicrobianos e antioxidantes das nanopartículas de ouro mostraram-se muito eficazes na cicatrização de feridas e regeneração de tecidos de colágeno danificados (VOLKOVA et al. 2016). As nanopartículas de ouro estão envolvidas na secreção de proteínas (IL-8, IL-12, VEGF e TNF-α) que são importantes candidatos para a cicatrização de feridas por meio de sua atividade antiangiogênica e anti-inflamatória (PIVODOVÁ et al. 2015).

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAOUF, Neveen; AL-ENAZI, Nouf Mohammad; IBRAHEEM, Ibraheem BM. Green biosynthesis of gold nanoparticles using Galaxaura elongata and characterization of their antibacterial activity. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S3029-S3039, 2017.

AICHELE, K. et al. Bromelain down-regulates myofibroblast differentiation in an in vitro wound healing assay. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 386, n. 10, p. 853–863, 15 out. 2013.

AKBARI, M.; ORYAN, A.; HATAM, G. Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A Review. **Acta Tropica**, v. 172, p. 86–90, ago. 2017.

AKTURK, Omer et al. Collagen/gold nanoparticle nanocomposites: a potential skin wound healing biomaterial. **Journal of biomaterials applications**, v. 31, n. 2, p. 283-301, 2016.

AL-KINANI, Maha A.; HAIDER, Adawiya J.; AL-MUSAWI, Sharafaldin. Design, construction and characterization of intelligence polymer coated core–shell nanocarrier for curcumin drug encapsulation and delivery in lung cancer therapy purposes. **Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials**, v. 31, n. 1, p. 70-79, 2021.

AL-MUSAWI, Sharafaldin et al. Antibacterial activity of honey/chitosan nanofibers loaded with capsaicin and gold nanoparticles for wound dressing. **Molecules**, v. 25, n. 20, p. 4770, 2020.

AMINI, A. et al. Cytotoxic effects of bromelain in human gastrointestinal carcinoma cell lines (MKN45, KATO-III, HT29-5F12, and HT29-5M21). **OncoTargets and Therapy**, p. 403, abr. 2013.

ASIM, M. et al. A Review on Pineapple Leaves Fibre and Its Composites. **International Journal of Polymer Science**, v. 2015, p. 1–16, 2015.

ATAIDE, J. A. et al. Bacterial Nanocellulose Loaded with Bromelain: Assessment of Antimicrobial, Antioxidant and Physical-Chemical Properties. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 18031, 21 dez. 2017.

BALA, M. et al. Bromelain Production: Current Trends and Perspective. **Archives Des Sciences**. V. 65, p. 369-399, 2012.

BOOMI, P. et al. Biological synergy of greener gold nanoparticles by using Coleus aromaticus leaf extract. **Materials Science and Engineering: C**, v. 99, p. 202-210, 2019.

BORRELLI, F. et al. Inhibitory effects of bromelain, a cysteine protease derived from pineapple stem (Ananas comosus), on intestinal motility in mice. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 23, n. 8, p. 745-e331, ago. 2011.

BRESOLIN, I. R. A. P. et al. Isolation and purification of bromelain from waste peel of pineapple for therapeutic application. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 6, p. 971–979, dez. 2013.

BRITO, A. M. M. et al. Collagenase Activity of Bromelain Immobilized at Gold Nanoparticle Interfaces for Therapeutic Applications. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 8, p. 1143, 27 jul. 2021.

Bromelain. Monograph. **Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic**, v. 15, n. 4, p. 361–8, dez. 2010.

CATANZANO, Ovidio et al. Advanced multi-targeted composite biomaterial dressing for pain and infection control in chronic leg ulcers. **Carbohydrate polymers**, v. 172, p. 40-48, 2017.

CHEN, X. et al. Mussel-inspired polydopamine-assisted bromelain immobilization onto electrospun fibrous membrane for potential application as wound dressing. **Materials Science and Engineering: C**, v. 110, p. 110624, maio 2020.

COLLINS, J. L. **The Pineapple**. London: Leonard Hill Books Ltd., 1960.

COSTA, S. A. et al. Fibers of cellulose sugarcane bagasse with bromelain enzyme immobilized to application in dressing. **SN Applied Sciences**, v. 2, n. 2, p. 285, 29 fev. 2020.

DARAEE, Hadis et al. Application of gold nanoparticles in biomedical and drug delivery. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 410-422, 2016.

DAVARAN, Soodabeh et al. Physicochemical characteristics of Fe 3 O 4 magnetic nanocomposites based on poly (N-isopropylacrylamide) for anti-cancer drug delivery. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 1, p. 49-54, 2014.

DAVE, S. et al. Inhibition of Adipogenesis and Induction of Apoptosis and Lipolysis by Stem Bromelain in 3T3-L1 Adipocytes. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. e30831, 24 jan. 2012.

DE QUEIROZ, Bárbara Brito.; TOMAZ, Alecsandra Ferreira. Eficácia do Curativo de Quitosana na Cicatrização: Uma Revisão Integrativa. **TEMA - Revista Eletrônica de Ciências**, v. 21, p. 34, 2021.

DHANDAYUTHAPANI, S. et al. Bromelain-Induced Apoptosis in GI-101A Breast Cancer Cells. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 4, p. 344–349, abr. 2012.

DOMINGUES, L. F. et al. In vitro and in vivo evaluation of the activity of pineapple (Ananas comosus) on Haemonchus contortus in Santa Inês sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 1–2, p. 263–270, out. 2013.

EBRAHIMNEZHAD, Zohreh et al. Inhibition of hTERT gene expression by silibinin-loaded PLGA-PEG-Fe3O4 in T47D breast cancer cell line. **BioImpacts: BI**, v. 3, n. 2, p. 67, 2013.

FEIJOO-SIOTA, Lucía; VILLA, Tomás G. Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 6, p. 1066-1088, 2011.

FOUZ, N.; AMID, A.; HASHIM, Y. Z. H.-Y. Cytokinetic Study of MCF-7 Cells Treated with Commercial and Recombinant Bromelain. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, n. 11, p. 6709–6714, 30 nov. 2013.

FRANKOVÁ, Jana et al. Effects of silver nanoparticles on primary cell cultures of fibroblasts and keratinocytes in a wound-healing model. **Journal of applied biomaterials & functional materials**, v. 14, n. 2, p. 137-142, 2016.

FREITAS, K. M. et al. Healing activity of proteolytic fraction (P1G10) from Vasconcellea cundinamarcensis in a cutaneous wound excision model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 269–278, dez. 2017.

GAUTAM, S. S. et al. Comparative study of extraction, purification and estimation of bromelain from stem and fruit of pineapple plant. **Thai Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, n. 2, 2010.

GUDMUNDSDÓTTIR, Ágústa; HILMARSSON, Hilmar; STEFANSSON, Bjarki. Potential use of Atlantic cod trypsin in biomedicine. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

HEINICKE, R. M.; GORTNER, W. A. Stem bromelain—a new protease preparation from pineapple plants. **Economic Botany**, v. 11, n. 3, p. 225-234, 1957.

HOSSAIN, M. F.; AKHTAR, S.; ANWAR, M. Nutritional Value and Medicinal Benefits of Pineapple. **International Journal of Nutrition and Food Sciences**, v. 4, n. 1, p. 84, 2015.

HOSSEININASAB, Sara et al. Retracted: Synthesis, Characterization, and In vitro Studies of PLGA–PEG Nanoparticles for Oral Insulin Delivery. **Chemical biology & drug design**, v. 84, n. 3, p. 307-315, 2014.

HULLA, J. E.; SAHU, S. C.; HAYES, A. W. Nanotechnology: History and future. **Human & experimental toxicology**, v. 34, n. 12, p. 1318-1321, 2015.

HU, W. et al. Debriding Effect of Bromelain on Firearm Wounds in Pigs. **Journal of Trauma: Injury, Infection & Critical Care**, v. 71, n. 4, p. 966–972, out. 2011.

IRAM, Sana et al. Cisplatin bioconjugated enzymatic GNPs amplify the effect of cisplatin with acquiescence. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-16, 2019.

JIN, Juan et al. Rapid in situ biosynthesis of gold nanoparticles in living platelets for multimodal biomedical imaging. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 163, p. 385-393, 2018.

KABA, Said I.; EGOROVA, Elena M. In vitro studies of the toxic effects of silver nanoparticles on HeLa and U937 cells. **Nanotechnology, science and applications**, v. 8, p. 19, 2015.

KAWDE, Abdel-Nasser et al. Cathodized gold nanoparticle-modified graphite pencil electrode for non-enzymatic sensitive voltammetric detection of glucose. **Electroanalysis**, v. 29, n. 5, p. 1214-1221, 2017.

KETNAWA, S.; CHAIWUT, P.; RAWDKUEN, S. Extraction of bromelain from pineapple peels. **Food Science and Technology International**, v. 17, n. 4, p. 395–402, 3 ago. 2011.

KIM, Ji Eun et al. Accelerated healing of cutaneous wounds using phytochemically stabilized gold nanoparticle deposited hydrocolloid membranes. **Biomaterials science**, v. 3, n. 3, p. 509-519, 2015.

KRIEGER, Y. et al. Efficacy of enzymatic debridement of deeply burned hands. **Burns**, v. 38, n. 1, p. 108–112, fev. 2012.

KRIEGER, Y. et al. Bromelain-based enzymatic debridement and minimal invasive modality (mim) care of deeply burned hands. **Annals of burns and fire disasters**, v. 30, n. 3, p. 198–204, 30 set. 2017.

KUMAR, V. et al. Global market scenario of industrial enzymes. **Industrial enzymes: Trends, scope and relevance. Nova Science Publishers, New York**, p. 173-196, 2014.

LAU, PikSuan et al. Influence of gold nanoparticles on wound healing treatment in rat model: photobiomodulation therapy. **Lasers in surgery and medicine**, v. 49, n. 4, p. 380-386, 2017.

LAUREANO, A.; RODRIGUES, A. M. CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS. **Journal of the Portuguese Society of Dermatology and Venereology**, v. 69, n. 3, p. 355, 28 set. 2011.

LAZARUS, Geraldine Genevive; SINGH, Moganavelli. In vitro cytotoxic activity and transfection efficiency of polyethyleneimine functionalized gold nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 145, p. 906-911, 2016.

LEITE, N. S. et al. Determination of optimal condition to obtain the bromelain from pineapple plants produced by micropropagation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 5, p. 647–652, out. 2012b.

LEY, C. M. et al. A review of the use of bromelain in cardiovascular diseases. **Journal of Chinese Integrative Medicine**, v. 9, n. 7, p. 702–710, 15 jul. 2011.

LIMA, I.; MAZZOLA, P.; ATAIDE, J.; TUNDISI, L. Hidrogéis de PNIPAAm-co-aam como sistemas carreadores de bromelina. **Revista dos Trabalhos de Iniciação Científica da UNICAMP**, *[S. l.]*, n. 27, p. 1-1, 2019.

LOPES, Lourdes et al. Silver and gold nanoparticles from tannic acid: synthesis, characterization and evaluation of antileishmanial and cytotoxic activities. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, p. 2679-2689, 2018.

MAHMOUD, Nouf N. et al. Gold nanoparticles loaded into polymeric hydrogel for wound healing in rats: Effect of nanoparticles' shape and surface modification. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 565, p. 174-186, 2019.

MARCHESINI, B. F.; RIBEIRO, S. B. Efeito da ozonioterapia na cicatrização de feridas. **Fisioterapia Brasil**, v. 21, n. 3, p. 281–288, 31 ago. 2020.

MARTELLI, A. et al. Microcorrente no processo de cicatrização: revisão da literatura. **ARCHIVES OF HEALTH INVESTIGATION**, v. 5, n. 3, 12 jul. 2016.

MARTELLI, A.; ANDRADE, T. A. M. DE; SANTOS, G. M. T. DOS. Perspectivas na utilização de fitoterápicos na cicatrização tecidual: revisão sistemática. **ARCHIVES OF HEALTH INVESTIGATION**, v. 7, n. 8, 12 set. 2018.

MCCARTY, S. M.; PERCIVAL, S. L. Proteases and Delayed Wound Healing. **Advances in Wound Care**, v. 2, n. 8, p. 438–447, out. 2013.

MORTON, J. F.; DOWLING, C. F. **Fruits of warm climates**. Miami: ECHO Development Notes (EDN), 1987. v. 20534

MÜLLER, S. et al. Placebo-controlled Randomized Clinical Trial on the Immunomodulating Activities of Low- and High-Dose Bromelain after Oral Administration - New Evidence on the Antiinflammatory Mode of Action of Bromelain. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 2, p. 199–204, fev. 2013.

NASSR, M. S.; ABU-NASER, S. S. Knowledge Based System for Diagnosing Pineapple Diseases. **International Journal of Academic Pedagogical Research (IJAPR)**, v. 2, n. 7, p. 12–19, jul. 2018.

NIKALJE, Anna Pratima et al. Nanotechnology and its applications in medicine. **Med chem**, v. 5, n. 2, p. 081-089, 2015.

NUNES, Marília de Oliveira. Efeito de uma biomembrana de proteínas do látex de Calotropis procera (AIT.) R. BR na cicatrização: Estudos pré-clínico e clínico piloto. Fortaleza, 2018.

OLIVEIRA, R. G.; ALMEIDA, J. R. G. S. PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DE Ananas comosus (BROMELIACEAE). **Revista Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 2, n. 5, p. 515–523, 5 dez. 2012.

PAN, Anqiang et al. Topical application of keratinocyte growth factor conjugated gold nanoparticles accelerate wound healing. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 14, n. 5, p. 1619-1628, 2018.

PATRY, J.; BLANCHETTE, V. Enzymatic debridement with collagenase in wounds and ulcers: a systematic review and meta-analysis. **International Wound Journal**, v. 14, n. 6, p. 1055–1065, dez. 2017.

PAVAN, R. et al. Properties and Therapeutic Application of Bromelain: A Review. **Biotechnology Research International**, v. 2012, p. 1–6, 10 dez. 2012.

PEIXOTO, D. M. et al. Use of honey associated with Ananas comosus (Bromelin) in the treatment of acute irritative cough. **Revista Paulista de Pediatria (English Edition)**, v. 34, n. 4, p. 412–417, dez. 2016.

PERNODET, Nadine et al. Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts. **Small**, v. 2, n. 6, p. 766-773, 2006.

PILLAI, K. et al. Anticancer effect of bromelain with and without cisplatin or 5-FU on malignant peritoneal mesothelioma cells. **Anti-Cancer Drugs**, v. 25, n. 2, p. 150–160, fev. 2014.

PIVODOVÁ, Veronika et al. In vitro AuNPs' cytotoxicity and their effect on wound healing. **Nanobiomedicine**, v. 2, p. 7, 2015.

PRISTO, I. Cicatrização de feridas: fases e fatores de influência. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 4, p. 267–271, 2012.

PURSEGLOVE, John William. Monocotyledons. [s.l.] **Longman Scientific & Technical**, 1975.

QASIM, M. et al. Nanotechnology for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 10, p. 7374–7387, 1 out. 2014.

RAMLI, A. N. M. et al. Comparative structural analysis of fruit and stem bromelain from Ananas comosus. **Food Chemistry**, v. 266, p. 183–191, nov. 2018.

ROJAS, L. F. et al. Extraction and identification of endopeptidases in convection dried papaya and pineapple residues: A methodological approach for application to higher scale. **Waste Management**, v. 78, p. 58–68, ago. 2018.

ROSENBERG, L. et al. Selectivity of a bromelain based enzymatic debridement agent: A porcine study. **Burns**, v. 38, n. 7, p. 1035–1040, nov. 2012.

SCHULZ, A. et al. Effect of Bromelain-Based Enzymatic Debridement on Skin Cells. **Journal of Burn Care & Research**, v. 39, n. 4, p. 527–535, 13 jun. 2018.

SILVA, A. R. G. Estudos Termodinâmicos em Sistemas de Duas Fases Aquosas para a Purificação de Bromelina de Resíduos Agroindustriais, **Dissertação de Mestrado**, Autor: André Rodrigues Gurgel da Silva, Campinas – SP, 2014.

SILVA, J. L. A. DA et al. UTILIZAÇÃO DE ABACAXI PARA ELABORAÇÃO DE VINHOS: AVALIAÇÃO FISICO QUÍMICA E ACEITABILIDADE. **HOLOS**, v. 3, p. 108, 21 set. 2010.

SOUSA, M. S. B. et al. Caracterização nutricional e compostos antioxidantes em resíduos de polpas de frutas tropicais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 3, p. 554–559, jun. 2011.

THIRUPPATHIRAJA, Chinnasamy et al. An enhanced immuno-dot blot assay for the detection of white spot syndrome virus in shrimp using antibody conjugated gold nanoparticles probe. **Aquaculture**, v. 318, n. 3-4, p. 262-267, 2011.

VASCONCELOS, A. L. DE et al. Tillandsia recurvata L. (Bromeliaceae): aspectos farmacognósticos. **Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada**, v. 34, n. 2, 2013.

VOLKOVA, Nataliia et al. Application of cryopreserved fibroblast culture with Au nanoparticles to treat burns. **Nanoscale research letters**, v. 11, n. 1, p. 1-6, 2016.

ZAWRAH, M. F.; EL-MOEZ, S. A.; CENTER, Dokki. Antimicrobial activities of gold nanoparticles against major foodborne pathogens. **Life Sci J**, v. 8, n. 4, p. 37-44, 2011.

WANG, Gufeng et al. Optical imaging of non-fluorescent nanoparticle probes in live cells. **Analyst**, v. 135, n. 2, p. 215-221, 2010.

WU, S.-Y. et al. Bromelain Ameliorates the Wound Microenvironment and Improves the Healing of Firearm Wounds. **Journal of Surgical Research**, v. 176, n. 2, p. 503–509, ago. 2012.

YARISWAMY, M. et al. Topical application of serine proteases from Wrightia tinctoria R. Br.(Apocyanaceae) latex augments healing of experimentally induced excision wound in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 149, n. 1, p. 377-383, 2013.

CAPÍTULO 2

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ASSOCIAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO COM BROMELINA

RESUMO

O extrato do caule e dos frutos verdes oriundos de vegetais da família Bromeliaceae (principalmente o abacaxi - *Ananas comosus*) contém um conjunto de enzimas proteolíticas conhecidas genericamente como Bromelina, a qual, são atribuídas diversas atividades farmacológicas, como a ação cicatrizante e anti-inflamatória, que podem ser aprimoradas com o auxílio de nanomateriais. A nanotecnologia dispõe de diversas formas de utilização no ramo farmacêutico, incluindo o uso de nanopartículas que atuam como veículos para distribuição de compostos derivados. Esse estudo teve por objetivos extrair a enzima bromelina, preparar nanopartículas de ouro (AuNPs), associar essas nanopartículas com a enzima bromelina e realizar testes de caracterização para observar estabilidade, tamanho, índice de polidispersão, morfologia e atividade enzimática dessa associação. As nanopartículas apresentaram uma estabilidade moderada de -27,8 mV, tamanho médio de 47,6 nm e índice de polidispersão de 0,391. Após a associação, atingiram valores de -12 mV, 1,24 μm e 0,536, respectivamente. A microscopia mostrou que as nanopartículas produzidas foram esféricas e apresentaram um diâmetro real de 20 nm após a associação. Nas nanopartículas de ouro, a bromelina foi associada em cerca de 77%, com atividade enzimática de 23,36 U/mL, confirmando a atividade após adsorção. Portanto, o complexo formado por nanopartículas de ouro e bromelina apresentou boas características físicas e uma ótima atividade proteolítica quando comparada com a literatura científica, e por isso, sugere-se sua aplicação posterior em filmes curativos, através de novos estudos.

Palavras-chave: Protease. Bromelina. Nanotecnologia. Cicatrização.

ABSTRACT

The extract of the stem and green fruits from vegetables of the Bromeliaceae family (mainly pineapple - Ananas comosus) contains a set of proteolytic enzymes known generically as Bromelain, which are attributed with various pharmacological activities, such as healing and anti-inflammatory action. , which can be improved with the help of nanomaterials. Nanotechnology has several forms of use in the pharmaceutical sector, including the use of nanoparticles that act as vehicles for the distribution of composite compounds. This study aimed to extract the bromelain enzyme, prepare gold nanoparticles (AuNPs), associate these nanoparticles with the bromelain enzyme and carry out characterization tests to observe the stability, size, polydispersity index, morphology and enzymatic activity of this association. The nanoparticles showed a moderate stability of -27.8 mV, an average size of 47.6 nm and a polydispersity index of 0.391. After association, they reached values of -12 mV, 1.24 μm and 0.536, respectively. Microscopy showed that the nanoparticles produced were spherical and contained an actual diameter of 20 nm upon association. In the gold nanoparticles, bromelain was associated in approximately 77%, with an enzymatic activity of 23.36 U/mL, confirming the activity after adsorption. Therefore, the complex formed by gold nanoparticles and bromelain showed good physical characteristics and excellent proteolytic activity when compared with scientific literature, and therefore, its further application in healing films is suggested, through new studies.

Keywords: Protease. Bromelain. Nanotechnology. Healing.

1 INTRODUÇÃO

O mecanismo de cicatrização é um complexo processo biológico que envolve eventos celulares e moleculares para a reconstituição de tecidos lesionados. Este processo surge como resposta do tecido a lesões induzidas por trauma ou por procedimentos cirúrgicos, sendo caracterizado por três fases que se sobrepõem e apresentam características especificas: fase inflamatória, fase proliferativa e fase de remodelação (MARTELLI et al., 2016). A fase de remodelação de uma ferida é regulada por proteases, enzimas cuja conformação e atividade coordenada dependem de fatores locais, como o pH e a colonização bacteriana do local da ferida. (LAUREANO & RODRIGUES, 2011). O grupo das proteases é responsável por quebrar as ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas (SILVA et al., 2014).

As proteases e seus inibidores contribuem para o equilíbrio entre a degradação e a deposição da matriz extracelular (MEC), criando um ambiente essencial para a cicatrização oportuna e coordenada de feridas cutâneas. Quando esse equilíbrio é interrompido, as feridas são levadas a um estado de cronicidade caracterizado por níveis abundantes de proteases e níveis diminuídos de inibidores de protease (MCCARTY & PERCIVAL, 2013). As proteases de cisteína estão presentes em todos os organismos vivos. Várias dessas enzimas foram purificadas parcial ou completamente para aplicações terapêuticas. A papaína foi a primeira cisteína protease isolada e caracterizada. As proteases de cisteína estão presentes também no complexo enzimático bromelina (BRITO et al., 2021).

A bromelina é um conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nos tecidos, no caule, nas folhas e no fruto do abacaxi e em outras espécies de plantas da família *Bromeliaceae* (RAMLI et al., 2018; ROJAS et al., 2018). Formada principalmente por enzimas proteolíticas contendo sulfidrila, a bromelina também contém escarase (um componente não proteolítico com efeitos de desbridamento em feridas), peroxidase, fosfatase ácida, glucosidases, celulases, vários inibidores de protease, glicoproteínas, carboidratos e cálcio organicamente ligados (AMINI et al., 2013).

A bromelina possui aplicações clínicas e terapêuticas importantes, podendo ser usadas no tratamento de várias doenças como angina, indigestão, problemas respiratórios (LEITE et al., 2012). Possui efeitos antimetastáticos, atua em alergias e outros processos imunológicos (BRESOLIN et al., 2013). Os efeitos colaterais são raros, de modo que é, também, aplicada em odontologia e em uma ampla variedade de lesões esportivas (AICHELE et al., 2013). Além disso, essas proteínas são muito utilizadas em processos de cicatrização e desbridamento seletivo de feridas, por possuir atividades anti-inflamatória e fibrinolítica (LIMA et al., 2019).

Nanomateriais possuem excelentes propriedades biológicas, o que os torna adequados para fins médicos e podem interagir com organelas celulares e proteínas, como as enzimas. Essas interações podem ser usadas para o desenvolvimento de novos materiais médicos e farmacêuticos (PIVODOVÁ et al., 2015). No campo da cicatrização de feridas várias abordagens com nanopartículas (NPs) foram desenvolvidas para acelerar o processo de recuperação tecidual, ativando diferentes fases de cicatrização. Nanopartículas metálicas, como prata, zinco e ouro, apresentam propriedades atrativas como baixa toxicidade in vivo e atividade antimicrobiana (CATANZANO et al., 2017; FRANKOVA et al., 2016; KABA & EGOROVA, 2015).

As nanopartículas desempenham um papel importante no diagnóstico e tratamento de doenças devido a maior razão área/volume (QASIM et al. 2014, AKBARI et al. 2017). Em particular, as nanopartículas de ouro (AuNPs), amplamente utilizadas para melhorar os curativos para o tratamento de feridas cutâneas (AL-KINANI; HAIDER; AL-MUSAWI, 2021). Essas nanopartículas têm alta biocompatibilidade e propriedades ópticas, eletrônicas e catalíticas únicas, constituindo uma plataforma ideal para proteínas bioativas, como enzimas. Os estudos sobre o uso de nanopartículas associadas a proteínas vêm aumentando exponencialmente, pois esses sistemas são capazes de melhorar a estabilidade e protegê-los contra a desnaturação da digestão enzimática, reduzir a toxicidade, além de aumentar a solubilidade e permeabilidade (BRITO et al., 2021).

Esse estudo aborda o processo de carreamento do complexo enzimático bromelina em nanopartículas de ouro. Para isto, as enzimas obtidas foram incorporadas nas nanopartículas, e esse complexo foi caracterizado. O objetivo dessa associação foi analisar a integridade das enzimas e do nanocarreador, a fim de avaliar sua estrutura e potencial atividade proteolítica para trabalhos de cicatrização de ferimentos. A relevância desse estudo é perceptível, pois não foram encontrados autores que explorassem a atividade proteolítica e integridade da associação química entre bromelina e nanopartículas de ouro (AuNPs).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

Foram usados tri-hidrato de ácido tetracloroáurico ($HAuCl_4.3H_2O$, 99,9%), reagente de Bradford à base de corante Coomassie Brilliant Blue G-250 e caseína de leite bovino obtidos da Sigma Aldrich (St Louis, MO, EUA); citrato trissódico di-hidratado ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$) da Êxodo

Científica (SP, Brasil); tampão fosfato composto de fosfato de sódio monobásico P.A. da Anidrol (SP, Brasil) e fosfato de sódio dibásico P.A. da Vetec (RJ, Brasil); etanol 70° INPM da Super Sol (MG, Brasil); Abacaxis *Ananas comosus* fornecidos pelo Banco Ativo de Germoplasma da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) de Cruz das Almas, Brasil; água Milli-Q de resistividade 18,2MΩ cm^{-1}.

2.2 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS

A metodologia utilizada para síntese das AuNPs seguiu o método de redução do ácido tetracloroáurico pelo citrato de sódio, que foi estabelecido por Turkevich et al. (1951) e adaptado por Bastús et al. (2011). Uma solução com 2,2 mM de citrato de sódio e 35,3 mL de água Milli-Q foi aquecida a 100°C por 15 min sob agitação vigorosa usando bécker tampado para evitar a evaporação do solvente. Após o início da ebulição, foi adicionado 1 mL de $HAuCl_4$ (25 mM) através de gotejamento controlado, obtendo as formas estruturais iniciais, chamadas de sementes de nanopartículas, em cerca de 10 minutos.

Logo após a síntese das sementes de AuNPs, iniciou-se o processo de crescimento das nanopartículas, para isso, a reação foi resfriada até a solução atingir uma temperatura de 90 °C. Em seguida, foi adicionado 1 mL de citrato de sódio (60 mM) e mais 1 mL de $HAuCl_4$ (25 mM) sequencialmente. Por fim, após 30 minutos sob agitação, a síntese foi finalizada, e então as nanopartículas foram armazenadas na geladeira em frascos de vidro devidamente limpos para posterior uso.

2.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO DE BROMELINA

A folha do abacaxi foi a parte utilizada para a preparação do extrato. Para isso, as folhas foram trituradas em meio tampão fosfato de sódio (0,2M, pH 6,0) na proporção de 1:1 (p/v) em um processador industrial. O produto foi filtrado em peneira de tecido voil para a remoção da parte sólida, depois centrifugado à 9.000 rpm, 4°C, durante 20 minutos. O precipitado foi descartado e o sobrenadante fracionado e armazenado a 0°C até sua utilização.

2.4 PURIFICAÇÃO DA ENZIMA E ADSORÇÃO EM NANOPARTÍCULAS DE OURO

A purificação da bromelina foi realizada através do gotejamento de etanol em um béquer contendo o extrato das folhas do abacaxi, e depois armazenado na geladeira por 1h (MIRANDA et al., 2021). A proporção do volume etanol-extrato enzimático foi de 2:1. O material foi centrifugado a 9000 rpm por 30 minutos, e o pellet residual ressuspenso. Logo após, foram adicionados 8mL de AuNPs em cada tubo falcon e colocados sob agitação orbital na incubadora shaker por 2h a 35ºC, e posteriormente centrifugados novamente a fim de obter o pellet do nanocomposto associado de bromelina e nanopartículas de ouro. Finalmente, 5mL de tampão fosfato foram adicionados e misturados ao pellet, que foi homogeneizado e armazenado na geladeira.

2.5 CURVA PADRÃO DE PROTEÍNA E EFICIÊNCIA DA ASSOCIAÇÃO

O teor de proteína foi medido em espectrofotômetro (Cary Varian, São Paulo, Brasil), de acordo com o método de Bradford (1976). A curva padrão de proteína foi realizada utilizando uma solução padrão de albumina de soro bovino (BSA) na concentração de 1 mg/mL. Posteriormente, diluições seriadas foram preparadas em concentrações de 0,1 a 1 mg/mL da solução de BSA. As amostras foram homogeneizadas em vórtex, seguidas de adição de 5mL de reagente de Bradford, e ao final, tiveram suas absorbâncias analisadas em espectrofotômetro a 595 nm.

A eficiência da associação (EA%) foi avaliada pela diferença de teor de proteína total no extrato enzimático e no sobrenadante após a associação. A eficiência de associação (EA) foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$EA\ \% = \frac{(C - S)}{C}\ x\ 100$$

Onde: C é a concentração de proteína total e S é concentração de proteína no sobrenadante.

2.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade enzimática foi calculada modificando o método de Murachi (1976): caseína a 1% (p/v) em tampão fosfato 50 mM (pH 6,0) foi utilizado como substrato. Alíquotas enzimáticas de

50 µL foram adicionadas a tubos contendo 500 µL da suspensão de caseína. A mistura foi mantida a 37 °C por 20 min. Após o tempo de reação, alíquotas de 40 µL foram transferidas para um tubo contendo 2 mL de reagente de Bradford. Por fim, a absorbância foi medida a 595 nm.

Uma unidade de atividade enzimática (UA) foi definida como a quantidade de bromelina necessária para consumir 1 µg de caseína por minuto (expressa em U/mL) a 37 °C. Com os valores de UA/min sobre concentração proteica média em mg/ml, permitiu-se calcular a atividade específica (AE), que representa a quantidade de proteínas bromelina contidas na reação, dada pela quantidade de caseína consumida em µg/mL/min.

2.7 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS ADSORVIDAS

A análise com espectrofotômetro UV-visível (Varian Cary® 50 Probe) foi utilizada para obtenção do gráfico de comprimento de onda. O Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Inc., Reino Unido) foi usado para avaliar potencial zeta (PZ), tamanho de partículas através do espalhamento dinâmico de luz (DLS) e índice de polidispersão (PdI). As características morfológicas e químicas das nanopartículas foram observadas usando a microscopia eletrônica de transmissão (TEM) através do JEM-2800, 200kv (JEOL USA Inc., Peabody, USA) equipado com um módulo de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) da Oxford Instruments.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

3.1.1 **Síntese das nanopartículas de ouro e associação com bromelina**

O processo de síntese resultou, ao final da reação, a formação das nanopartículas de ouro, indicada pela mudança de cor do incolor para cinza azulado, até finalmente atingir tonalidades avermelhadas. Essas AuNPs sintetizadas que passaram pela etapa de crescimento já descrita, foram associadas com a bromelina das folhas do abacaxi e formaram um complexo (Figura 1).

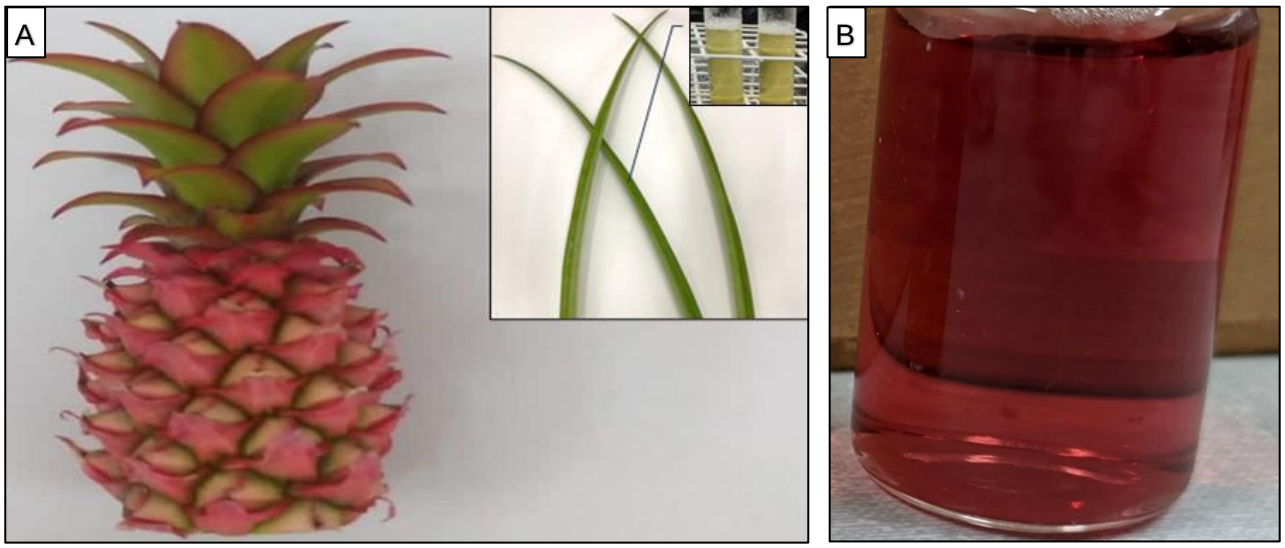


Figura 1: A- Abacaxi obtido para a pesquisa. O inset exibe as folhas do abacaxizeiro, que também são acompanhadas por bromelina, presente no extrato em detalhe. B- Solução coloidal avermelhada de nanopartículas de ouro ao fim da reação.

A temperatura e a adição de maiores quantidades de ouro e citrato de sódio na etapa de crescimento influenciaram o resultado da reação. Turkevich et al. (1951) mostraram que ao diminuir a temperatura para 90 °C, a taxa geral de nucleação se torna menor, caracterizada por redução da concentração, de modo que menos partículas de sementes seriam inicialmente produzidas, por isso, o tamanho final das partículas será maior se houver menos sementes em uma taxa de conversão equivalente. Por sua vez, Bastús et al. (2011) defende que uma nova adição dos constituintes da reação pode ampliar a distribuição de tamanhos, favorecendo o crescimento.

3.1.2 **Caracterização das nanopartículas de ouro**

A Figura 2 mostra a leitura antes e depois da associação com a bromelina, onde, inicialmente atingiram um pico de absorbância da banda de ressonância plasmônica de superfície (SRP) de 518 nm, e de 535,5 nm para as NPs que passaram pela associação, o que representa a média da triplicata obtida.

À medida que o tamanho relativo das nanopartículas de ouro aumenta, o pico máximo de absorção do comprimento de onda se desloca. É possível perceber que após a associação, as nanopartículas de ouro apresentaram absorbância em comprimento de onda maior do que as

desassociadas, refletindo no valor que havia sido absorvido. O estudo de Hong & Li (2013) também demonstrou a diferença nos espectros de absorção UV-Vis de nanopartículas de ouro entre 17 e 80 nm de diâmetro, onde verificou-se que o comprimento de onda com absorbância máxima aumentou de 519 nm para 550 nm a partir do momento que as nanopartículas se tornaram maiores.

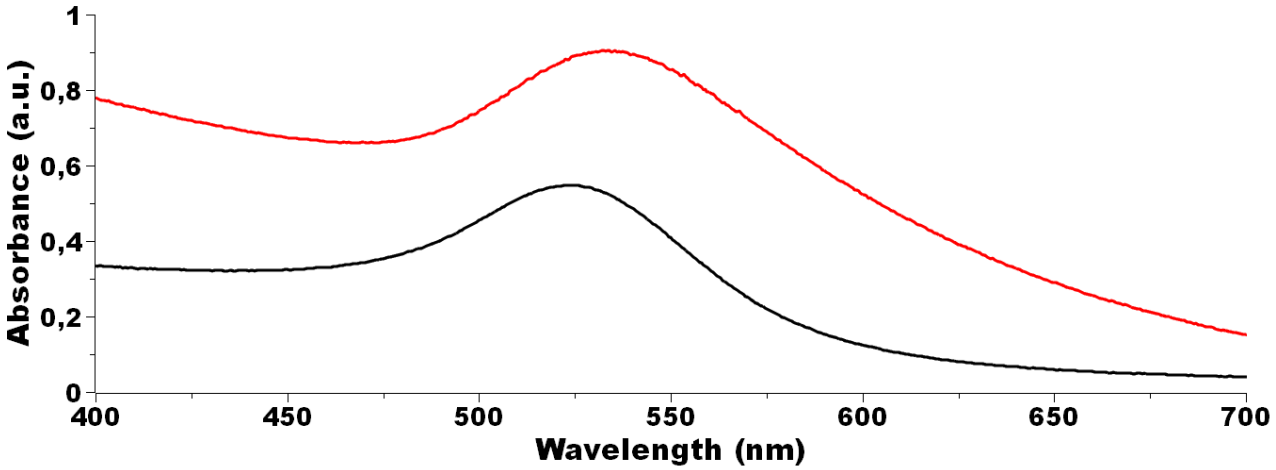


Figura 2: Leitura de espectrofotometria mostrando comparativo do comprimento de onda das AuNps antes (linha preta) e após (linha vermelha) a associação com bromelina.

O estudo morfológico da distribuição obtido por microscopia mostrou que as AuNps sintetizadas e associadas à bromelina eram esféricas e apresentavam homogeneidade morfológica. Uma imagem de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM) de uma nanopartícula de ouro esférica típica de 20 nm é mostrada na inserção (Figura 3A). O espaçamento dos planos da rede cristalina indicados na imagem é de aproximadamente 0,248 nm, que corresponde à face (111) do plano cristalino da rede cúbica de ouro. A área de difração selecionada (SAD) mostra e confirma as outras famílias de planos cristalinos de ouro (Figura 3B).

Ao contar o diâmetro das nanopartículas de ouro associadas à bromelina, obteve-se uma distribuição de tamanho real de aproximadamente 20 nm. (Figura 3C). A composição atômica da amostra foi determinada por meio da técnica EDS, na qual a emissão de raios X produzidos por transições eletrônicas permite estabelecer e confirmar os átomos constituintes da amostra. O espectro de emissão pode ser visto na Figura 3D.

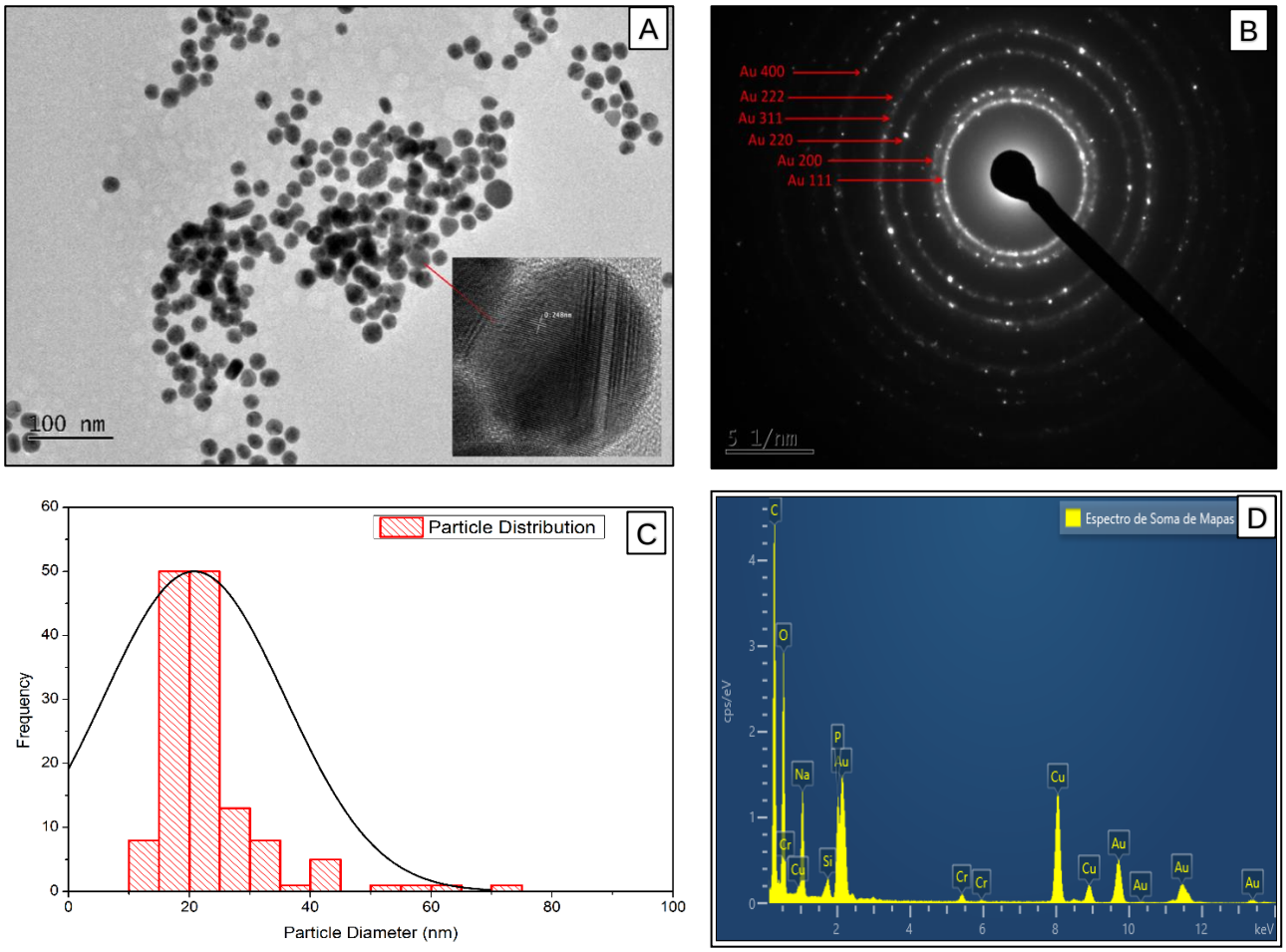


Figura 3: A- Imagem de microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas associadas na escala de 100 nm. O inset mostra os planos cristalinos de átomos de nanopartículas de ouro na escala de 5 nm. B- Padrão de difração de elétrons de área selecionada da distribuição de nanopartículas. C- Histograma de distribuição de tamanho de nanopartículas de ouro associadas à bromelina. D- Espectro de emissão de raios-X determinado por espectroscopia de energia dispersiva.

Leituras de potencial zeta foram realizadas nas amostras para avaliação da carga superficial das partículas da solução coloidal. A Tabela 1 representa os valores encontrados. Os resultados das análises antes da associação mostram que as nanopartículas possuem estabilidade moderada, apresentando uma média de -27,8 mV, com pouca agregação das estruturas. Esse achado corrobora a ideia proposta por Lu & Kessler (2006), onde o valor absoluto do Potencial Zeta deve ser superior a -25mV para que o coloide seja considerado estabilizado, por outro lado, valores menores que -15mV tendem a sofrer agregação severa.

O espalhamento dinâmico de luz foi utilizado para avaliar o tamanho das AuNPs presentes na solução coloidal. O tamanho médio obtido das nanopartículas isoladas foi de 47,6 nm (Tabela 1). Esse valor representa NPs que já passaram por crescimento, com alteração da concentração de seus constituintes. Em relação ao Índice de Polidispersão (PdI), as nanopartículas desassociadas apresentaram 0,391, caracterizando um valor moderadamente polidisperso.

Após a associação das AuNPs com a bromelina, a média do potencial zeta partiu de -27,8 mV para aproximadamente -12 mV (Tabela 1). A redução da carga negativa pode ser explicada pela adsorção de outros constituintes do extrato das folhas do abacaxi, além do complexo enzimático bromelina, na superfície das AuNPs, correlacionado a isso, as estruturas formadas possuem uma maior facilidade a agregar, diminuindo seu potencial de se manter com estabilidade moderada.

A avaliação do tamanho das AuNPs associadas também foi realizada. A média das leituras processadas alcançou aproximadamente 1.240 nm ou 1,24 μm (Tabela 1). Esse valor representa NPs crescidas, associadas com bromelina, formando complexos de expressivo aumento de tamanho em comparação com estruturas isoladas. Em relação ao Índice de Polidispersão (PdI) as nanopartículas associadas apresentaram 0,54, caracterizando ainda um valor moderadamente polidisperso, porém, menos homogêneo que a amostra de nanopartículas desassociadas.

Tabela 1: Média do tamanho, índice de polidispersão (PdI) e potencial zeta das nanopartículas isoladas e associadas.

Nanopartículas	Tamanho (nm)	Índice de Polidispersão	Potencial Zeta (mV)
AuNPs	47,6	0,39	-27,8
AuNPs+Bromelina	1240	0,54	-11,9

A adição de bromelina em busca da sua adsorção nas nanopartículas de ouro pode ter afetado a camada difusa de íons, refletindo na redução de sua estabilidade, pois a estabilidade da partícula coloidal é determinada por condições como a carga que o coloide exerce sobre a camada difusa, e a distância iônica entre as mesmas. A bromelina pode ter reprimido estas duas condições, fazendo o coloide perder estabilidade, favorecendo a aproximação de outras partículas.

3.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA, EFICIÊNCIA DE ASSOCIAÇÃO E ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A figura 4 mostra a curva padrão construída para cálculo da concentração proteica e determinação da atividade enzimática. A partir da análise de regressão linear, o coeficiente de determinação (R^2) e a equação da reta foram calculados, possibilitando calcular o valor da

concentração de proteínas totais e a atividade proteolítica por minuto (UA/min). O coeficiente de determinação ($R^{2)}$ foi de 0,99, indicando proximidade ao valor 1, e adequação dos resultados.

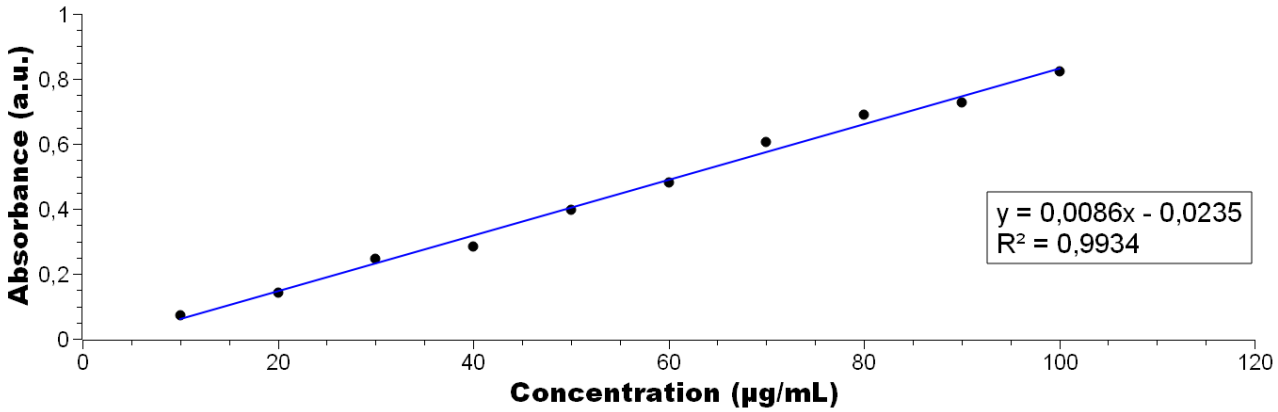


Figura 4: Curva padrão de albumina de soro bovino usada como curva de calibração.

O teor proteico da enzima purificada com etanol foi 31,59±1,74 µg/mL e atividade proteolítica de 315,91±17,41 UA/mL. No sobrenadante da associação obteve-se um teor de proteína de 7,37±0,00 µg/mL e 73,70±3,69 de atividade proteolítica (Tabela 2).

Tabela 2: Teor de proteína, atividade proteolítica e atividade específica da bromelina das folhas do abacaxi e do sobrenadante da associação.

	Proteína (µg/mL)	**Atividade Proteolítica (U/mL)**	**Atividade Específica (U/mg)**
Enzima	31,59±1,74	315,91±17,41	15,80±0,87
Sobrenadante	7,37±0,00	73,70 ±3,69	3,69 ±0,00

Médias dos valores obtidos com seus respectivos DP.

A atividade proteolítica da bromelina já foi estudada em algumas pesquisas. De Souza et al. (2015) realizaram a conjugação de bromelina ao poli (ácido acrílico), mantendo atividade enzimática de 76%. Costa et al. (2013), determinaram a atividade proteolítica de resíduos do abacaxi com variação do pH, onde obtiveram atividade proteolítica de 28,38 UA/min para a casca e

21,95 UA/min para a coroa, além de atividade específica de 351,18 e 261,93 μg/min/mg para casca e coroa, respectivamente. Ataide et al. (2019) mostraram que mais de 79% da atividade enzimática permaneceu nas NPs de bromelina-quitosana. Em 2021, os mesmos autores obtiveram atividade enzimática de 4,9 UA/min nas nanopartículas estudadas, o que corresponde a 104,7% de atividade de bromelina livre, confirmando sua integridade ao encapsulamento. Por último, não foram encontrados estudos que identificassem a atividade proteolítica da bromelina presente nas folhas do abacaxi, nem associadas com AuNPs, que se enquadrassem nos critérios esperados.

A atividade proteolítica da enzima associada foi de 23,36±3,49 UA/min, confirmando a eficiência do processo de associação. No processo de associação, algumas enzimas podem não ser adsorvidas nas nanopartículas. Com isso, seguido a etapa de centrifugação da amostra para estabelecer o pellet do nanocomposto de bromelina e nanopartículas de ouro, as enzimas não ligadas podem se encontrar dispersas no sobrenadante.

Um dado fundamental nesse trabalho é a determinação da porcentagem de associação entre as enzimas e as AuNPSs. Obteve-se uma associação de 76,61±1,26% entre o complexo formado. Para se chegar a esse percentual, utilizou-se a eficiência da associação (EA%) que foi avaliada pela determinação do teor de proteína na enzima purificada e no sobrenadante da associação.

Alguns autores relataram a eficiência de encapsulação e associação adquirida em suas pesquisas. Ataide et al. (2021) descobriram a eficiência de encapsulamento calculada como 85,1% ± 1% em relação à atividade enzimática de NPs de bromelina-quitosana. Miranda et al. (2021) obteve uma eficiência de encapsulação de 71,5 ± 0,91% em estudo de lipossomos e bromelina. Baker, Patwardhan e Numata (2014) demonstraram uma eficiência de encapsulação de mais de 70% para bromelina absorvida em agregados de nanoesferas de sílica. Por fim, não foram encontrados autores que relatassem a porcentagem de associação específica entre bromelina e AuNPs.

4 CONCLUSÃO

Este estudo apresenta uma nova abordagem para a síntese química e caracterização de nanopartículas de ouro associadas com bromelina, na qual a enzima não foi utilizada como agente redutor, mas sim como molécula associada. Nesse estudo, foi sugerido que as nanopartículas atuam como carreadores das enzimas, para que melhor exerçam sua função proteolítica. Como resultado, os testes de caracterização sugerem que as nanopartículas de ouro associadas apresentaram estabilidade coloidal, tamanho e morfologia adequados para um sistema de carreamento. A associação do complexo enzimático com as AuNps obteve média aproximada de 77% e a atividade

proteolítica foi de 23,36 UA/min. Essas informações mostram que as nanopartículas de ouro podem atuar como ótimos transportadores de bromelina, pois possuem boas características físicas e atividade proteolítica, e por isso, o complexo possui condições apropriadas para seguir com uso em testes de cicatrização, o que vai depender de estudos futuros para otimização dos processos e aplicação em lesões induzidas na pele.

REFERÊNCIAS

AICHELE, K. et al. Bromelain down-regulates myofibroblast differentiation in an in vitro wound healing assay. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 386, n. 10, p. 853–863, 15 out. 2013.

AKBARI, M.; ORYAN, A.; HATAM, G. Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A Review. **Acta Tropica**, v. 172, p. 86–90, ago. 2017.

AL-KINANI, Maha A.; HAIDER, Adawiya J.; AL-MUSAWI, Sharafaldin. Design, construction and characterization of intelligence polymer coated core–shell nanocarrier for curcumin drug encapsulation and delivery in lung cancer therapy purposes. **Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials**, v. 31, n. 1, p. 70-79, 2021.

AMINI, A. et al. Cytotoxic effects of bromelain in human gastrointestinal carcinoma cell lines (MKN45, KATO-III, HT29-5F12, and HT29-5M21). **OncoTargets and Therapy**, p. 403, abr. 2013.

ATAIDE, Janaína Artem et al. Effect of Polysaccharide Sources on the Physicochemical Properties of Bromelain–Chitosan Nanoparticles. **Polymers**, v. 11, n. 10, p. 1681, 2019.

ATAIDE, Janaína Artem et al. Freeze-dried chitosan nanoparticles to stabilize and deliver bromelain. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 61, p. 102225, 2021.

BAKER, Peter J.; PATWARDHAN, Siddharth V.; NUMATA, Keiji. Synthesis of homopolypeptides by aminolysis mediated by proteases encapsulated in silica nanospheres. **Macromolecular Bioscience**, v. 14, n. 11, p. 1619-1626, 2014.

BASTÚS, Neus G.; COMENGE, Joan; PUNTES, Víctor. Kinetically controlled seeded growth synthesis of citrate-stabilized gold nanoparticles of up to 200 nm: size focusing versus Ostwald ripening. **Langmuir**, v. 27, n. 17, p. 11098-11105, 2011.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRESOLIN, I. R. A. P. et al. Isolation and purification of bromelain from waste peel of pineapple for therapeutic application. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 6, p. 971–979, dez. 2013.

BRITO, A. M. M. et al. Collagenase Activity of Bromelain Immobilized at Gold Nanoparticle Interfaces for Therapeutic Applications. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 8, p. 1143, 27 jul. 2021.

CATANZANO, Ovidio et al. Advanced multi-targeted composite biomaterial dressing for pain and infection control in chronic leg ulcers. **Carbohydrate polymers**, v. 172, p. 40-48, 2017.

COSTA, Helber Barcellos et al. Determinação do teor de proteínas totais e da atividade proteolítica de resíduos agroindustriais do processamento de frutos do abacaxizeiro (Ananas comosus var. comosus) cv. Pérola. Scientia Plena, v. 9, n. 7 (a), 2013.
.
DE SOUSA, Irene Pereira et al. Nanoparticles decorated with proteolytic enzymes, a promising strategy to overcome the mucus barrier. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 97, p. 257-264, 2015.

FRANKOVÁ, Jana et al. Effects of silver nanoparticles on primary cell cultures of fibroblasts and keratinocytes in a wound-healing model. **Journal of applied biomaterials & functional materials**, v. 14, n. 2, p. 137-142, 2016.

HONG, Seongmin; LI, Xiao. Optimal size of gold nanoparticles for surface-enhanced Raman spectroscopy under different conditions. **Journal of nanomaterials**, v. 2013, p. 49-49, 2013.

KABA, Said I.; EGOROVA, Elena M. In vitro studies of the toxic effects of silver nanoparticles on HeLa and U937 cells. **Nanotechnology, science and applications**, v. 8, p. 19, 2015.

KUNITZ, Mf. Crystalline soybean trypsin inhibitor: II. General properties. **The Journal of General Physiology**, v. 30, n. 4, p. 291-310, 1947.

LAUREANO, A.; RODRIGUES, A. M. CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS. **Journal of the Portuguese Society of Dermatology and Venereology**, v. 69, n. 3, p. 355, 28 set. 2011.

LEITE, N. S. et al. Determination of optimal condition to obtain the bromelain from pineapple plants produced by micropropagation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 5, p. 647–652, out. 2012b.

LIMA, I.; MAZZOLA, P.; ATAIDE, J.; TUNDISI, L. Hidrogéis de PNIPAAm-co-aam como sistemas carreadores de bromelina. **Revista dos Trabalhos de Iniciação Científica da UNICAMP**, *[S. l.]*, n. 27, p. 1-1, 2019.

LU, Kathy; KESSLER, Chris. Colloidal dispersion and rheology study of nanoparticles. **Journal of materials science**, v. 41, n. 17, p. 5613-5618, 2006.

MARTELLI, A. et al. Microcorrente no processo de cicatrização: revisão da literatura. **ARCHIVES OF HEALTH INVESTIGATION**, v. 5, n. 3, 12 jul. 2016.

MCCARTY, S. M.; PERCIVAL, S. L. Proteases and Delayed Wound Healing. **Advances in Wound Care**, v. 2, n. 8, p. 438–447, out. 2013.

MIRANDA, Íngara Keisle São Paulo Barretto et al. Development of membranes based on carboxymethyl cellulose/acetylated arrowroot starch containing bromelain extract carried on nanoparticles and liposomes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 110, n. 6, p. 2372-2378, 2021.

MURACHI, T. Bromelain Enzymes. In: Lorand L. Methods Enzymol 1976; 45:475-85.

PIVODOVÁ, Veronika et al. In vitro AuNPs' cytotoxicity and their effect on wound healing. **Nanobiomedicine**, v. 2, p. 7, 2015.

QASIM, M. et al. Nanotechnology for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 10, p. 7374–7387, 1 out. 2014.

RAMLI, A. N. M. et al. Comparative structural analysis of fruit and stem bromelain from Ananas comosus. **Food Chemistry**, v. 266, p. 183–191, nov. 2018.

ROJAS, L. F. et al. Extraction and identification of endopeptidases in convection dried papaya and pineapple residues: A methodological approach for application to higher scale. **Waste Management**, v. 78, p. 58–68, ago. 2018.

SILVA, A. R. G. Estudos Termodinâmicos em Sistemas de Duas Fases Aquosas para a Purificação de Bromelina de Resíduos Agroindustriais, **Dissertação de Mestrado**, Autor: André Rodrigues Gurgel da Silva, Campinas – SP, 2014.

TURKEVICH, John; STEVENSON, Peter Cooper; HILLIER, James. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, v. 11, p. 55-75, 1951.