



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
FACULDADE DE VETERINÁRIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE HUMANA E
ANIMAL

EDUARDO HENRIQUE BARROS FERREIRA

AVALIAÇÃO DAS AÇÕES PROTEOLÍTICA E HEMOCITOTÓXICA DA
BROMELINA NA SECREÇÃO DE PACIENTES HUMANOS
TRAQUEOSTOMIZADOS: UM ESTUDO *IN VITRO*

FORTALEZA - CEARÁ

2023

EDUARDO HENRIQUE BARROS FERREIRA

AVALIAÇÃO DAS AÇÕES PROTEOLÍTICA E HEMOCITOTÓXICA DA BROMELINA
NA SECREÇÃO DE PACIENTES HUMANOS TRAQUEOSTOMIZADOS: UM
ESTUDO *IN VITRO*

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal.

Área de concentração: Biotecnologia em Saúde

Linha de pesquisa: Desenvolvimento de bioprodutos– prospecção, identificação e caracterização.

Orientador: Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula.

Coorientador: Prof. Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo.

FORTALEZA - CEARÁ

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Estadual do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo SidUECE, mediante os dados fornecidos pelo(a)

Ferreira, Eduardo Henrique Barros.

Avaliação das ações proteolíticas e hemocitotóxica da bromelina na secreção de pacientes humanos traqueostomizados: um estudo in vitro [recurso eletrônico] / Eduardo Henrique Barros Ferreira. - 2023.

75 f. : il.

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Curso de Mestrado Profissional - Programa de Pós-graduação Em Biotecnologia Em Saúde Humana E Animal, Teresina, 2023.

Orientação: Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula..

Coorientação: Prof. Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo.

1. Bioprospecção. 2. Bromeliaceae. 3. Ananas Comosus. 4. Traqueostomia.. I. Título.


EDUARDO HENRIQUE BARROS FERREIRA

AVALIAÇÃO DAS AÇÕES PROTEOLÍTICA E HEMOCITOTÓXICA DA BROMELINA
NA SECREÇÃO DE PACIENTES TRAQUEOSTOMIZADOS: UM ESTUDO *IN*
VITRO

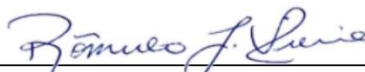
Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal.

Aprovado em: 25 / 09 / 2023.


AVALIAÇÃO

Documento assinado digitalmente
 NEY ROMULO DE OLIVEIRA PAULA
Data: 10/10/2023 14:24:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula (Orientador)
Universidade Estadual do Ceará- UECE



Prof. Dr. Rômulo José Vieira
1º Avaliador

Documento assinado digitalmente
 HERCILIA MARIA LINS ROLIM
Data: 10/10/2023 14:44:02-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Hercília Maria Lins Rolim
2º Avaliadora

Documento assinado digitalmente
 MARIANA DE OLIVEIRA SANCHEZ
Data: 10/10/2023 16:05:30-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Mariana de Oliveira Sanchez
3º Avaliadora

Dedico este trabalho a minha Família! Pai, Mãe e irmãos, em especial minha esposa e filhos, que sempre me apoiaram e nunca me deixaram desistir, sem vocês eu não teria conseguido, amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo Dom da vida e a graça de chegar a mais uma etapa na minha vida, a minha família, a meus amigos e anjos da guarda que me ajudaram e apoiaram na construção deste sonho.

Aos meus professores aqui, em especial ao meu orientador Prof. Dr. Ney Rômulo e coorientador Prof. Dr. Daniel Arcanjo, pelo apoio e maestria nos ensinamentos na construção deste trabalho.

Ao amigo Otávio Carvalho e amiga Karine Costa Melo que estavam sempre solícitos em ajudarem com seus conhecimentos.

E a todos aqueles que de alguma forma pode estar torcendo, apoiando e ajudando para a chegada deste dia. Gratidão sempre, que Deus abençoe a todos, este meu desejo de coração!

“Só fazemos melhor aquilo que repetidamente insistimos em melhorar. A busca da excelência não deve ser um objetivo, e sim um hábito”.

(Aristóteles)

RESUMO

A traqueostomia ocasiona a diminuição da atividade ciliar e altera a integridade da mucosa traqueal, o que aumenta a ocorrência de secreções, deixando o paciente mais suscetível a infecções. Diante disso, como atualmente os extratos vegetais com alto teor de enzimas proteolíticas vem sendo usados abundantemente na medicina tradicional, a bromelina se torna uma grande aliada no combate das secreções. O estudo tem como objetivo avaliar a ação proteolítica da bromelina na secreção de pacientes humanos traqueostomizados. Trata-se de um estudo experimental *in vitro*, no qual foram realizados testes para avaliar a atividade enzimática da bromelina, o seu potencial de hemotoxicidade, teste de viscosidade em secreção sem e com extrato de bromelina para verificar a ação desse extrato sobre as secreções pulmonares coletadas dos doadores e testes para avaliação da capacidade de coagulação da bromelina. O estudo foi submetido ao comitê de ética do Centro Universitário UNIFACEMA com aprovação sob parecer 5.901.121. Foram identificados que com o aumento da concentração de bromelina na secreção há uma maior atividade proteolítica da mesma nas amostras de caseína e biológicas, não foram observados diferença significativas quanto à viscosidade entre o grupo basal e os grupos que receberam bromelina em quaisquer concentrações, no qual a bromelina não apresentou toxicidade. A análise dos dados obtidos nos testes *in vitro* constataram que o aumento da bromelina era proporcional ao aumento da sua atividade enzimática, corroborando com outros estudos que apontam os benefícios da substância, sugerindo sua segurança para futuras pesquisas *in vivo*.

Palavras-chave: bioprospecção; Bromeliaceae; Ananas Comosus; traqueostomia.

ABSTRACT

Tracheostomy causes a decrease in ciliary activity and alters the integrity of the tracheal mucosa, which increases the occurrence of secretions, leaving the patient more susceptible to infections. In view of this, as plant extracts with a high content of proteolytic enzymes are currently being used abundantly in traditional medicine, bromelain has become a great ally in the fight against secretions. This study aims to evaluate the proteolytic action of bromelain on the secretions of tracheostomized patients. This is an *in vitro* experimental study in which tests were carried out to evaluate the enzymatic activity of bromelain, its potential for hemotoxicity, a viscosity test on secretions without and with bromelain extract to verify the action of this extract on pulmonary secretions collected from donors and tests to evaluate bromelain's coagulation capacity. The study was submitted to the ethics committee of the UNIFACEMA University Center with approval under opinion 5.901.121. It was found that as the concentration of bromelain in the secretion increased, there was greater proteolytic activity in the casein and biological samples. No significant differences were observed in viscosity between the baseline group and the groups that received bromelain at any concentration, and bromelain did not show toxicity. Analysis of the data obtained in the *in vitro* tests showed that the increase in bromelain was proportional to the increase in its enzymatic activity, corroborating other studies that point to the benefits of the substance, suggesting its safety for future *in vivo* research.

Keywords: Bioprospecting; bromeliaceae; *Ananas Comosus*; tracheostomy.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 1- | Análise estrutural de bromelinas do caule e fruta..... | 20 |
| Figura 2- | Traqueostomia por técnica aberta..... | 26 |
| Figura 3- | Traqueostomia por técnica percutânea..... | 26 |
| Figura 4- | Determinação da atividade enzimática da bromelina isolada em pó por tempo..... | 39 |
| Figura 5- | Análise da Razão de Hemólise em testes <i>in vitro</i> | 40 |
| Figura 6- | Representação do tempo de Protrombina conforme escores e média de tempo..... | 40 |
| Figura 7- | Análise do tempo de tromboplastina parcial ativada conforme medida de tempos e escores..... | 41 |
| Figura 8- | Representação dos valores de viscosidade cinemática em diferentes secreções de muco pulmonar após adição de variadas concentrações de extrato de bromelina em pó..... | 52 |
| Figura 9- | Análise de viscosidade das secreções do muco pulmonar em diferentes concentrações de Bromelina..... | 52 |

LISTAS DE QUADROS

| | | |
|-----------|--|----|
| Quadro 1- | Lista de plantas comumente consumidas no Brasil e seu uso popular..... | 22 |
|-----------|--|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------|---|
| ANOVA | Análise de Variância |
| ATPS | Extração por Sistema Aquoso de Duas Fases |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PNPMF | Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos |
| SPSS | <i>Statistical Package for the Social Sciences</i> |
| SUS | Sistema Único de Saúde |
| TCLE | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido |
| UTI | Unidade de Terapia Intensiva |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 2 | OBJETIVOS..... | 16 |
| 2.1 | Geral..... | 16 |
| 2.2 | Específicos..... | 16 |
| 3 | REFERENCIAL TEÓRICO..... | 17 |
| 3.1 | Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos (PNPMF)... | 17 |
| 3.2 | Caracterização e extração da bromelina..... | 19 |
| 3.2.1 | Obtenção da bromelina em pó..... | 21 |
| 3.3 | O uso da bromelina enquanto fitoterápico e suas principais aplicações..... | 22 |
| 3.4 | Indicação clínica da traqueostomia e complicações associadas..... | 25 |
| 3.5 | Hematotoxicidade dos fitoterápicos..... | 27 |
| 4 | ARTIGO 1: AVALIAÇÃO DA AÇÃO PROTEOLÍTICA E HEMOCITOTÓXICA DA BROMELINA NA SECREÇÃO DE PACIENTES TRAQUEOSTOMIZADOS: um estudo in vitro..... | 29 |
| 5 | ARTIGO 2: AVALIAÇÃO DA BROMELINA QUANTO A VISCOSIDADE DA SECREÇÃO DE PACIENTES TRAQUEOSTOMIZADOS: UM ESTUDO IN VITRO..... | 44 |
| 6 | CONCLUSÃO..... | 55 |
| | REFERÊNCIAS..... | 56 |
| | ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO..... | 66 |
| | ANEXO B- CARTA DE APRECIÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA..... | 71 |
| | ANEXO C- COMPROVANTE DE AQUISIÇÃO DE BROMELINA..... | 75 |
| | ANEXO D – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO NA REVISTA CONEXÕES-CIÊNCIAS E TECNOLOGIA (QUALIS A2) | 77 |
| | ANEXO E – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO NA REVISTA INTERFACES - SAÚDE, HUMANAS E TECNOLOGIA (QUALIS A3)... | 77 |

1 INTRODUÇÃO

A traqueostomia foi padronizada como procedimento cirúrgico com refinamentos em 1923 por Chevalier Jackson, que diminuiu a mortalidade dessa técnica de 25% para 2%. Na realidade atual, dados os avanços tecnológicos, a traqueostomia está difundida como um procedimento médico eficaz com técnicas bem estabelecidas (RICZ, 2011). Ela é indicada quando há um impedimento para que a respiração siga seu trajeto natural, como por exemplo em algumas cirurgias de cabeça e pescoço e em pacientes que precisam respirar com a ajuda de aparelhos por determinada razão (CAETANO; SANTOS, 2020).

Dessa forma, com o avanço da pandemia de COVID-19, e, conseqüentemente, o aumento do número de pessoas infectadas e o agravamento dos sintomas, entre eles, complicações respiratórias, a traqueostomia vem sendo bastante realizada em pacientes em estado crítico como forma de facilitar a ventilação mecânica a longo prazo e o desmame da ventilação (BALAKRISHNAN *et al.*, 2020).

Contudo, segundo Furkim e Santini (2008), a traqueostomia ocasiona a diminuição da atividade ciliar e altera a integridade da mucosa traqueal, o que aumenta a ocorrência de secreções, deixando o paciente mais suscetível a aspirações e infecções. Além disso, ela causa também uma alteração na umidificação, aquecimento e filtração do ar, pois ao invés do ar inspirado realizar o percurso normal pelas narinas, ele passa pela abertura da traqueia e vai direto para os pulmões, ocasionando o ressecamento da mucosa e abundância de secreção, podendo chegar a completa obstrução das vias aéreas.

Neste sentido, os extratos vegetais com alto teor de enzimas proteolíticas vem sendo usados abundantemente na medicina tradicional no combate das secreções, onde a bromelina tem se tornado uma grande aliada (PEIXOTO *et al.*, 2016). Bromelina é o nome genérico empregado a um grupo de enzimas proteolíticas achadas nos vegetais da família *Bromeliaceae*, sendo o abacaxi o mais conhecido, e inclusive, bastante consumido aqui no Brasil, tendo diversos nutrientes e apresentando um bom custo-benefício (ALMEIDA *et al.*, 2009; VIEIRA *et al.*, 2020).

Diversos estudos relatam sobre a sua função mucolítica, uma vez que ela é uma enzima com a capacidade de facilitar a diluição do muco por meio da quebra de ligações de peptídeos, tendo significativa ação no sistema respiratório (MAHMOOD *et al.*, 2017; PASSALI *et al.*, 2018; SOARES *et al.*, 2021). Isenta de efeitos colaterais

graves, como hemorragias ou lesões aos órgãos, a bromelina tem demonstrado efeitos promissores em estudos *in vitro* não apenas na função mucolítica, como também na ação anticoagulante e anti-inflamatória (PEIXOTO *et al.*, 2016). Seu efeito anti-inflamatório está ligado à redução dos níveis séricos prostaglandina E2 e do tromboxano B2, além do aumento da permeabilidade tecidual, que favorece a reabsorção do edema. Já seu efeito anticoagulante ainda não está completamente explicado, mas acredita-se que ela modula seletivamente o nível de prostaglandina E2 (PGE2) e tromboxano A2 pertencentes às prostaglandinas (HIKISZ; BERNASINSKA-SLOMCZEWSKA, 2021).

Visto que, a bromelina é uma substância que pode ser extraída do abacaxi, considerada uma das frutas com maior utilidade para a indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia, e que pode ser obtida tanto da polpa como de partes não comestíveis a mesma torna-se extremamente viável para realização de diversas pesquisas. Ela tem sido alvo por seu potencial imunomodulador, nutracêutico e proteolítico, ganhando espaço durante a pandemia (SOARES *et al.*, 2021) por sua capacidade para ultrapassar a barreira de muco e aumentar a biodisponibilidade das drogas via oral ou atuar fluidificando a secreção produzida por pacientes humanos traqueostomizados para facilitar sua eliminação. Sendo de suma importância buscar meios de utilizá-la de forma a garantir maior eficácia e segurança.

Além disso, contém propriedades antioxidantes, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, e principalmente potencial anti-inflamatório e propriedades anticâncer, funcionando como um auxiliador no processo de digestão, devido a sua ação enzimática, e como um agente cardioprotetor (ALI *et al.*, 2020; ZDROJEWICZ *et al.*, 2020).

Dessa forma, baseada em uma experimentação científica, a realização do estudo contribuirá na recomendação da enzima bromelina analisada como uma alternativa terapêutica aos medicamentos sintéticos, utilizados para fluidificar as secreções produzidas por pacientes humanos traqueostomizados, onde em estudos futuros poderão ser realizados *in vivo*, para oferecer uma alternativa eficaz e com menos efeitos colaterais que os fármacos atualmente utilizados.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a ação proteolítica da bromelina na secreção de pacientes humanos traqueostomizados.

2.2 Específicos

- Comparar por meio de testes *in vitro* a ação proteolítica da bromelina em pó isolada sobre a secreção traqueal humana;
- Analisar a ação mucolítica da bromelina na viscosidade do escarro de pacientes humanos traqueostomizados;
- Determinar a ação da bromelina e seus efeitos na hemólise e coagulação sanguínea.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Política Nacional De Plantas Medicinais E Fitoterápicos (PNPMF)

A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos – PNPMF foi efetivada através do Decreto Nº 5.813, de 22 de junho de 2006, que define as diretrizes e ações para o uso seguro e racional de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil, além de incentivar e promover o desenvolvimento de tecnologias, inovações e arranjos produtivos de forma sustentável da biodiversidade do país. Em 1987 e 1991 a OMS reforçou sobre a importância da medicina tradicional não somente para ciência, mas também para a assistência prestada, principalmente para as populações que enfrentam dificuldades em ter acesso aos serviços de saúde (DE FIGUEREDO; GURGEL; GURGEL JÚNIOR, 2014).

A construção da PNPMF advém de um longo processo histórico, iniciado em 1978 com a Conferência Internacional sobre Atenção Primária em Saúde em Alma-Ata em Genebra sobre proteção e promoção da saúde, em seguida no final da década de 1970 foi criado o Programa de Medicina Tradicional pela Organização Mundial de Saúde (OMS) que recomendava o desenvolvimento de políticas públicas para facilitar a integração da medicina tradicional e da medicina complementar alternativa.

A OMS definiu que suas estratégias globais para 2002/2005 incluíam a inserção da medicina tradicional e medicina complementar e alternativa nos sistemas de saúde, reforçando a necessidade de construir políticas públicas, e a partir desse período começaram as discussões e formulações da PNPMF, publicada oficialmente em 2006. Levando em consideração que o Brasil uma grande parcela de biodiversidade, em torno de 15% a 20% do total no mundo, e aproximadamente 24% da biodiversidade em plantas, torna-se necessário investir em pesquisas e formas de consumo consciente desse patrimônio sustentável (BRASIL, 2016).

De acordo com De Figueredo, Gurgel e Gurgel Júnior (2014) a prática fitoterápica inserida no Sistema Único de Saúde (SUS) representa mais que uma terapêutica acrescentada, e sim, um vasto arsenal de possibilidades para tratamento e pesquisas clínicas, com envolvimento do profissional de saúde e da comunidade, promovendo uma troca de saberes da cultura milenar com o campo científico.

A PNPMF tem como objetivo geral garantir que a população brasileira tenha acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional. Visa a ampliação das opções terapêuticas aos usuários, construção do marco regulatório para produção, distribuição e uso de plantas medicinais e fitoterápicos a partir dos modelos e das experiências existentes no Brasil e em outros países com garantia de acesso, promover pesquisa, desenvolvimento de tecnologias e inovações nessas plantas (BRASIL, 2016).

Além disso, a política está estruturada em dezessete diretrizes que norteiam e fortalecem as cadeias produtivas locais, promovendo a diminuição da dependência estratégica do Brasil, no setor de medicamentos fitoterápicos, e ainda possui diversas normativas para notificação e registro de fitoterápicos todos em vigência conforme propostas pela ANVISA (OLIVEIRA; ROPKE, 2016).

Ribeiro (2019) destaca que a partir da implementação da PNPMF, foi incorporado também o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos de 2008, que possibilitou uma expansão de programas em fitoterapia em todo o país, promovendo uma pluralidade no uso das plantas medicinais características de cada região, fortalecendo as diretrizes estabelecidas na política.

Apesar dos avanços e expansão da PNPMF desde sua criação até os dias atuais, ainda observa-se uma lacuna quanto ao papel dos profissionais de saúde nas práticas fitoterápicas, neste sentido, Souza *et al.* (2016) ao analisarem o conhecimento de enfermeiros em relação à política e ao programa, verificam que os profissionais apresentavam um conhecimento bastante limitado, o que reforça a necessidade de ampliação e difusão de conhecimento quanto a prática fitoterápica, bem como capacitações, pois é de extrema importância que os profissionais reconheçam a cultura e as diferentes visões de cuidado em saúde, para promover a cidadania e a autonomia dos usuários.

Complementando o pressuposto De Figueredo, Gurgel e Gurgel Júnior (2014) afirmam que após a implementação PNPMF, a fitoterapia está conquistando seu espaço cada vez mais, embora ainda existem muitos desafios, a política possibilitou a construção de programas em fitoterapias, mais serviços de saúde foram adicionados na prática clínica, muitos estados e municípios criaram políticas locais para o setor, e com a aprovação de leis específicas. Além disso, a fitoterapia também passou a ser incorporada a muitos cursos de graduação, o que favorece sua

disseminação e respaldo ético e científico, trazendo informações à sociedade sobre os mais diversos fitoterápicos, suas propriedades e como seus componentes são obtidos e extraídos, como é o caso do abacaxi e da bromelina.

3.2 Caracterização e extração da bromelina

A bromelina é uma mistura protéica heterogênea com alta atividade proteolítica à base de cisteína protease (GROSS *et al.*, 2020). Essas enzimas são utilizadas como fármacos para o tratamento de doenças. Além das proteinases-cisteína vegetais bromelina e papaína, o grupo compreende proteinases de órgãos animais, como tripsina e quimiotripsina, que tem um espectro de eficácias terapêuticas: comprovaram a partir de estudos *in vitro* e *in vivo*, ações anti-hematológicas, anti-inflamatórias, antitrombóticas e fibrinolíticas (MAURER, 2001).

A história da bromelina está ligada à do abacaxi. O abacaxi foi encontrado por Colombo em 1493 em Gouadeloupe. Foi usado como medicamento popular para curar diversas doenças pelos habitantes aborígenes da América Central e do Sul, usos relatados por exploradores no século XVII, que visitaram o Novo Mundo após sua descoberta por Colombo. Como um produto farmacêutico, a bromelina foi fabricada pela primeira vez em 1956 no Havaí (TAUSSIG; BATKIN, 1988).

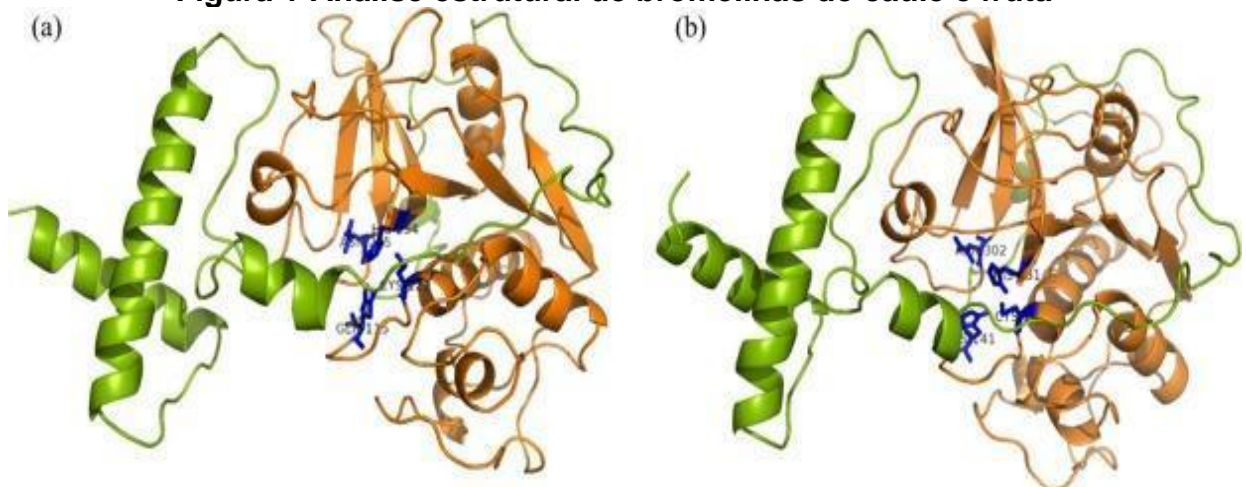
Dessa forma, a bromelina é uma proteína de significativa importância biológica e econômica. Desde a sua descoberta, um enorme progresso foi feito para entender suas funções e modo de ação. A estrutura única da bromelina elucidada como enzimas proteolíticas o que a torna valiosa para diversos fins (RAMLI *et al.*, 2018). Essa enzima quebra as ligações peptídicas dentro de uma molécula proteica. Pertence à família da papaína, com a qual tanto se assemelha inequivocamente no alinhamento da sequência de aminoácidos (ARSHAD *et al.*, 2014).

Sua forte atividade proteolítica criou um amplo interesse em inúmeras aplicações, principalmente em alimentos, detergentes e na indústria têxtil. A bromelina também foi considerada como ingrediente ativo em dentifrícios de branqueamento dentário e produtos para a pele (ARSHAD *et al.*, 2014). Essa enzima foi reconhecida como um tipo de agente terapêutico seguro e bem-sucedido, e está sendo usada por pessoas em todo o mundo para uma série de doenças, como bronquite, sinusite, artrite e inflamação (RATHNAVELU *et al.*, 2016).

A bromelina encontrada no caule do abacaxi (EC 3.4.22.32, anteriormente EC 3.4.22.4) tem um ponto isoelétrico (p-I) de 9,5 e é a protease mais abundante em preparações de tecido de abacaxi. Por outro lado, a bromelina encontrada na fruta (EC 3.4.22.33, anteriormente EC 3.4.22.5) tem um p-I de 4,6, está presente em quantidades menores em comparação com a do caule. Assim, há uma clara diferença nas propriedades entre a enzima do caule e da fruta (MAURER, 2001; SILVEIRA *et al.*, 2009; DE LENCASTRE NOVAES *et al.*, 2015). A bromelina do caule é mais alcalina e maior que a papaína (p I 8,75–9,55 e massa molar 23,4 kDa). Ao contrário, a da fruta é uma proteína ácida (ROWAN; BUTTLER, 1994).

A análise de aminoácidos realizada por Ramli *et al.* (2018) revelou diferenças mínimas entre as bromelinas do fruto e do caule. Os aminoácidos mais abundantes nas bromelinas do caule e da fruta são alanina, glicina e serina, enquanto a histidina está presente em menor quantidade. Além disso foi realizada análise estrutural de bromelinas de fruto e caule que mostrou uma dobra proteica típica da família da papaína. Os modelos analisados consistiam em 10 hélices α e 6 cadeias β . Como a papaína, os modelos de bromelina de fruto e caule foram caracterizados por terem duas estruturas de domínio com uma fenda entre os dois domínios que abriga o sítio ativo (bolsa catalítica) onde o substrato está ligado. Os domínios são totalmente α -hélice (domínio I29) e um domínio antiparalelo de folha β (domínio peptidase C1) (Figura 1).

Figura 1-Análise estrutural de bromelinas do caule e fruta



Legenda: A região verde indica o domínio I29, enquanto a região laranja indica o domínio da peptidase C1. Os aminoácidos catalíticos de ambos os modelos são representados como bastões. Fonte: Ramli *et al.* (2018).

O espectro do substrato desta enzima é igualmente amplo, estendendo-se de amidas e dipeptídeos sintéticos de baixa massa molecular até substratos de alto peso molecular, como fibrina, albumina, caseína, angiotensina II, bradicinina, etc. A bromelina cliva preferencialmente as ligações denominadas glicil, alanil e leucil (MAURER, 2001).

Desde a descoberta da bromelina, vários estudos foram realizados para investigar sua estabilidade, purificação e aplicações potenciais. Vários grupos de pesquisa estudaram suas propriedades físico-químicas e estabilidade em diferentes condições técnicas para sua purificação e posterior aplicação. O processo de extração da bromelina apresenta diferentes métodos e, os principais são: Extração líquido-líquido por sistemas bifásicos aquosos e por sistema micelar reverso; Filtração de membrana; e por processos cromatográficos (DE LENCASTRE NOVAES *et al.*, 2015; MANZOOR *et al.*, 2016).

3.2.1 Obtenção da bromelina em pó

No mercado de enzimas, a América Latina possui cerca de 3,4% da demanda global, no qual o Brasil é que tem 60% do consumo de enzimas na região (MONTEIRO; SILVA; 2009). A produção comercial da bromelina passa por vários processos, entre eles a extração, purificação e concentração, secagem e embalagem na forma de pó (NOR *et al.*, 2015). Dentre as abordagens utilizadas para a separação da bromelina tem-se a cromatografia, precipitação, sistema aquoso de duas fases e extração por filtração por membrana.

O processo de purificação por precipitação é realizado pela adição de um sal, um solvente orgânico, um polímero não-iônico, um metal, ou alterando o pH do meio (NOVAES *et al.*, 2016). A cromatografia pode purificar praticamente toda substância solúvel ou volátil, contando que a fase sólida e móvel e os métodos utilizados estejam corretos. A fase estacionária pode ser sólida, um líquido adsorvido a um sólido ou um gel; pode ser acondicionada em coluna ou espalhada sobre uma superfície, formando uma fina camada. A fase móvel pode ser líquida ou gasosa (MOTA *et al.*, 2006).

Na separação por sistema aquoso de duas fases, são usados dois polímeros hidrofílicos, como o polietilenoglicol (PEG) e dextrana ou usa-se um polímero e um sal, como o PEG e fosfato de potássio. Em condições favoráveis, a

proteína alvo então se separa na fase superior, que é menos densa, menos hidrofílica e menos polar, tendo potencial para ser retirada através de centrifugação (ARSHAD et al., 2014). Segundo Wankat (2006), o método de separação por membranas pode ser conceituado como a separação de um ou mais compostos por meio de uma barreira semipermeável.

3.3 O uso da Bromelina enquanto fitoterápico e suas principais aplicações

O termo fitoterapia significa sucintamente tratamento com utilização de plantas medicinais, entendendo-se assim, qualquer vegetal com potencial terapêutico, onde o Ministério da Saúde tem investido na utilização de práticas integrativas complementares, neste ponto, a fitoterapia tem destaque por ser altamente incentivada e utilizada em diversas regiões. Porém, para que sua implantação seja eficaz, é necessário ter conhecimento acerca da temática e formar profissionais qualificados para promover seu uso e, eliminar preconceitos acerca das práticas complementares entre os profissionais da saúde (FEITOSA et al., 2016).

Alguns fitoterápicos são amplamente conhecidos e consumidos pela população, entre eles destacam-se a kava, valeriana, flor-da-paixão (SILVA; SILVA, 2018); açafraão, trevo vermelho (MARQUES et al., 2016); chá verde, porangaba, goji bery e outros (VALGAS; QUEIROZ, 2017). O quadro 1 apresenta algumas plantas medicinais frequentemente consumidas e suas indicações.

Quadro 1-Lista de plantas comumente consumidas no Brasil e seu uso popular

| Espécie de Plantas | Família | Nome Popular | Uso Popular |
|---|------------------------|---------------------|--|
| <i>Ananas comosus</i> | <i>bromeliácea</i> | Abacaxi | O fruto, casca, e folhas são ricos em compostos antioxidantes, como a bormelina, vitamina C, polifenóis, carotenos, e taninos. |
| <i>Helicostylis tomentosa</i> (Poepp. & Endl) Rusby | <i>Moraceae</i> | Amoreira-preta | Seu fruto é usado como fonte nutricional |
| <i>Himatanthus bracteatus</i> (A.DC.) Woodson | <i>Apocynaceae</i> | Janaguba | O látex é aplicado topicamente para tratar úlceras externas e tumores. |
| <i>Miconia minutiflora</i> (Bonpl.) DC. | <i>Melastomataceae</i> | Mundururu | Seu fruto é usado como fonte nutricional |
| <i>Malpighia glabra</i> L. | <i>Malpighiaceae</i> | Acerola | Utilizado para minimizar sintomas de gripe |

| | | | |
|---------------------------------|-------------------|----------------|---|
| <i>Critus aurantium L.</i> | <i>Rutaceae</i> | Laranjeira | Utilizado para tratar má digestão e estresse |
| <i>Persea americana Mill.</i> | <i>Lauraceae</i> | Abacate | Utilizado para tratar dor nos rins |
| <i>Aloe sp.</i> | <i>Liliaceae</i> | Babosa-pequena | Próstata/gastrite/câncer/inflamação em geral |
| <i>Aloe vera (L.) Burm. f.</i> | <i>Liliaceae</i> | Babosa-grande | Queda de cabelo |
| <i>Critus limon L. Burm. f.</i> | <i>Rutaceae</i> | Limoeiro | Utilizado para minimizar sintomas de gripe |
| <i>Punica granatum L.</i> | <i>Punicaceae</i> | Romã | Utilizado para tratar dor de garganta, gripe e diarreia |

Fonte: Adaptado de Santos et al. (2016).

Havendo uma infinidade de plantas e alimentos com propriedades medicinais e nutracêuticas, o abacaxi ou ananás, natural da América do Sul é considerado por muitos autores como nativo do Brasil e tem importância na alimentação do povo desde o século XVI (TOMCHINSKY; MING, 2019). Tendo notoriedade por apresentar potencial para auxiliar ou tratar diversas patologias, sendo uma fruta que pode ser consumida diariamente (MURAKAMI et al., 2019).

O abacaxi é uma fruta rica em diversos nutrientes e que apresenta um bom custo-benefício, havendo plantações da fruta em algumas cidades do nordeste, onde a mesma completa a alimentação e colabora para melhorar a saúde e qualidade de vida da população (ALMEIDA et al., 2009). Neste aspecto, o Maranhão se destaca pela produção da fruta (RAMOS et al., 2020).

Existe uma ampla variedade de abacaxis que são produzidos e consumidos em todo o mundo. No qual cada variedade possui algumas características que as distinguem das demais, havendo ainda, diferenças entre valores nutricionais, mas destacando que no geral, os abacaxis apresentam carotenoides, proteínas, vitamina A, vitamina C, potássio, ferro, magnésio, zinco e cálcio. Durante um estudo de comparação entre duas variedades de abacaxi (abacaxi selvagem e abacaxi pérola), a variedade selvagem da fruta também apresentou grande valor nutricional. Deve-se destacar ainda, a presença da enzima bromelina (PAULA FILHO et al., 2016; PILLAI; AKHATER; MORRIS, 2017).

Neste contexto, a bromelina extraída do abacaxi, fruta que pode ser consumida in natura ou processada, é considerada muito importante para a fabricação de antioxidantes, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, entre outros (ALI et al., 2020). Ela pode ser obtida até das partes não comestíveis do abacaxi, possuindo potencial anti-inflamatório, antioxidante, propriedades anticâncer e funcionando também como um auxiliador no processo de digestão e como um agente

cardioprotetor (NOR et al., 2016; IZQUIERDO-VEGA et al., 2017; ZDROJEWICZ et al., 2020).

A bromelina apresenta características antibacterianas contra algumas bactérias como a *Enterococcus faecalis*, podendo ser uma alternativa a fármacos já utilizados, neste aspecto, a bromelina tem aplicação na odontologia com potencial para ser usada na irrigação endodôntica onde mais estudos devem ser realizados para comprovar os benefícios de seu uso (MAVANI et al., 2020). A mesma pode ser utilizada ainda como alternativa a anti-inflamatórios não esteroides, pois apresentam menor risco de gerar reações adversas (MENDES et al., 2019).

Por suas características anti-inflamatórias, a enzima apresenta grande potencial para atuar como suplemento para atletas, pois possivelmente pode reduzir pequenas lesões musculares e ocasionar regeneração muscular em menor tempo, principalmente em associação com outras substâncias, onde mais estudos devem ser realizados para comprovar a eficácia (HEATON et al., 2017). A bromelina tem ainda, capacidade para aplicação no desbridamento enzimático de feridas, porém, é necessária a realização de pesquisas para comprovar a eficiência e padronização da concentração adequada (HEITZMANN; FUCHS; SCHIEFER, 2020).

Em forma de nanopartículas ela é capaz ainda, de ampliar a permeabilidade da barreira de muco, degradando-a, sem causar a perda de sua função vital protetora, onde o rompimento da barreira acontece por meio do deslocamento de componentes do muco, quebrando algumas ligações de hidrogênio (WILCOX et al., 2015). Ao clivar a estrutura da mucosa, essas partículas reduzem a viscosidade do muco, e abrem caminho para a passagem das drogas (MAHMOOD et al., 2017).

Nos estudos de Sousa et al. (2015) com teste utilizando a bromelina em pesquisa in-vivo, obtiveram-se resultados através de diversas técnicas que comprovam a existência de uma forte correlação do uso de bromelina para biodisponibilidade farmacológica, no qual a mesma proporciona um efeito mais significativo na alteração da estrutura do muco, provocando um melhor desempenho na permeação e reduzindo a barreira imposta pelo muco, o que possibilita melhor absorção e aproveitamento de diversos fármacos.

O estudo de Passali et al. (2018) evidenciou que a bromelina apresentou potencial para tratar alergias e doenças paranasais, sendo adequada para uso nas vias aéreas superiores. Além de possuir características anti-inflamatórias, potencial

para atenuar a tempestade de citocinas ocasionada pela infecção por COVID-19 e ação imunomoduladora, nota-se que a mesma tem importante ação no sistema respiratório, pois muitas patologias respiratórias provocam excesso de muco e inflamação, neste sentido, a bromelina é uma enzima capaz de facilitar a fluidificação do muco através da quebra de ligações de peptídeos, sendo também uma opção para pacientes que fazem uso de traqueostomia (PEIXOTO et al., 2016; SOARES et al., 2021).

3.4 Indicação clínica da traqueostomia e complicações associadas

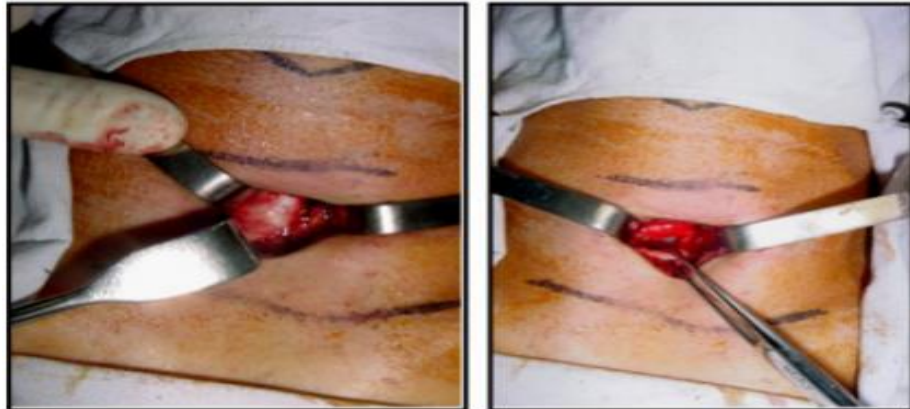
Desde a Antiguidade, há algumas descrições sobre a realização de traqueostomias, sendo a mais antiga um hieróglifo descoberto em uma pirâmide egípcia simulando a execução desse procedimento. Entretanto, apenas no ano 100 a.C., na Grécia, que a traqueostomia foi citada pela primeira vez, por Asclepiades (RICZ et al., 2011).

Sendo um procedimento cirúrgico que permite a abertura da traqueia, a traqueostomia tem como objetivo oferecer suporte ventilatório prolongado ao paciente ou auxiliá-lo no desmame do suporte ventilatório; favorecer a aspiração e higiene das vias respiratórias; e impedir complicações da intubação prolongada, como a estenose subglótica (PIAZZA et al., 2020; RODRIGUES FILHO; JUNGES, 2017). Ela pode ser permanente, quando o paciente precisa de ventilação definitiva, ou temporária, quando há a possibilidade de ser revertida. Essa indicação depende do quadro do paciente, de suas condições físicas, da situação da pele ao redor da incisão, entre outros (CAETANO; SANTOS, 2020).

De acordo com Zapata-Contreras, Hoyos-Cuervo e Florian-Perez (2019), as indicações clínicas da traqueostomia incluem obstrução das vias aéreas superiores, necessidade de ventilação mecânica prolongada ou proteção das vias aéreas, dificuldade de realização do desmame da ventilação mecânica, polineuropatia e escore de coma de Glasgow persistente < 8.

No âmbito de cuidados intensivos, a traqueostomia pode ser feita por técnica aberta como é mostrado na Figura 2, ou pela técnica percutânea por dilatação que foi introduzida em 1985 (PÉREZ et al., 2007).

Figura 2-Traqueostomia por técnica aberta



Fonte: Ricz et al. (2011).

Ao se comparar a técnica aberta convencional com a técnica percutânea, Bullido-Gómez de Las Heras et al. (2021) e Johnson-Obaseki, Veljkovic e Javidnia (2016) relatam que a técnica percutânea possui algumas vantagens, como poder ser realizada à beira do leito, menor incidência de infecção, procedimento mais econômico por não necessitar de pessoal ou recursos da sala de cirurgia, menos trauma no tecido e incisão menor na pele como mostra a Figura 3.

Figura 3-Traqueostomia por técnica percutânea



Fonte: www.anestesiario.org.

Quanto à finalidade, as traqueostomias podem ser preventivas, curativas e paliativas. As preventivas são aquelas realizadas para complementar procedimentos cirúrgicos que possam gerar obstruções das vias aéreas; as curativas têm como

objetivo manter a via aérea do paciente pérvia; já as paliativas são indicativas para diminuir o desconforto respiratório dos pacientes em situação terminal (CAETANO; SANTOS, 2020).

Com relação às complicações, elas são divididas em intraoperatórias e pós-operatórias, que podem ser precoces ou tardias. Como complicações intraoperatórias tem-se a parada respiratória; hemorragia dos vasos cervicais ou tireoidianos; edema agudo de pulmão; broncoaspiração de sangue; pneumotórax; lesão de esôfago; lesão do nervo laríngeo; e falso trajeto para o mediastino (RICZ et al., 2011).

Em seu estudo, Hortense (2007) cita como complicações pós-operatórias precoces o edema agudo pulmão pós-obstrutivo; hemorragias; obstrução ou deslocamento da cânula; apneia; infecções; pneumonia aspirativa; enfisema subcutâneo; e distúrbios de deglutição.

Já como complicações tardias podem ocorrer hemorragias devido a traumas causados pela cânula; fístula traqueoesofágica; fístula traqueocutânea ou cicatriz hipertrófica após a decanulação; traqueomalácia; estenose subglótica ou traqueal; e distúrbios de deglutição (RICZ et al., 2011).

Além de tudo, a traqueostomia também causa diversos impactos na vida do paciente, que sofre alterações fisiológicas, psicológicas, emocionais, sexuais e sociais, passando ainda por mudanças no seu estilo de vida, impactando seu convívio em sociedade e em família (CAETANO; SANTOS, 2020).

3.5 HEMATOTOXICIDADE DOS FITOTERÁPICOS

As plantas em geral, produzem uma grande variedade de metabólitos secundários que têm relação a mecanismos de proteção predadores e patógenos, independentemente de serem aptas para consumo ou não, neste sentido, a toxicidade apresentada por uma espécie vegetal tem ligação com o indivíduo, ao modo de exposição e a questões ambientais, onde associar casos de intoxicação a plantas pode ser uma situação complexa (CAMPOS et al., 2016).

Portanto, acrescenta-se que exames laboratoriais podem sofrer alterações com o uso de plantas medicinais, neste sentido, é necessário que seja realizado anamnese com pacientes aliados à análise dos resultados laboratoriais. Neste ponto, quanto se trata de hemototoxicidade é fundamental atentar-se ainda às formas de uso,

duração do tratamento e dose consumida, uso agudo ou crônico, e se a ingestão ocorreu imediatamente antes da coleta da amostra biológica (Santos et al., 2017).

Ressalta-se que substâncias fitoterápicas podem provocar alterações a nível sanguíneo através de três principais mecanismos: interferência direta em exames, alterando o resultado; efeitos fisiológicos, intoxicação ou indução de enzimas; efeito de contaminante, quando produtos à base de plantas podem ter contaminantes ambientais (Dasgupta & Bernard, 2006).

Portanto, investigar o potencial de hematotoxicidade da bromelina é necessário para avaliar sua segurança, projetando futuros riscos e benefícios e identificando maneiras de otimizar suas propriedades medicinais em diferentes concentrações sem oferecer riscos às pessoas.

ARTIGO 1

AVALIAÇÃO DA AÇÃO PROTEOLÍTICA E HEMOCITOTÓXICA DA BROMELINA NA SECREÇÃO DE PACIENTES TRAQUEOSTOMIZADOS: um estudo *in vitro*

Neste artigo é apresentado o resultado dos testes *in vitro* da bromelina quanto a sua ação proteolítica e hemocitotóxica em pacientes traqueostomizados, submetido e formatado no periódico Revista Conexões-Ciências e tecnologia (Qualis A2). A revista foi escolhida devido a sua relevância no meio acadêmico, abordagem multidisciplinar e interdisciplinar, possibilitando que o material seja compartilhado com um maior número de pesquisadores.

AValiação DA AÇÃO PROTEOLÍTICA E HEMOCITOTÓXICA DA BROMELINA NA SECREÇÃO DE PACIENTES TRAQUEOSTOMIZADOS: um estudo *in vitro*

Eduardo Henrique Barros Ferreira¹; Daniel Dias Rufino Arcanjo²; José Otávio Carvalho Sena de Almeida³; Rômulo José Vieira⁴; Ney Rômulo de Oliveira Paula⁵

RESUMO

A bromelina tem sido alvo de importantes pesquisas, devido ao seu potencial imunomodulador e nutracêutico, sua capacidade proteolítica permite ultrapassar a barreira de muco e aumentar a biodisponibilidade das drogas via oral ou atuar fluidificando a secreção produzida por pacientes traqueostomizados facilitando sua eliminação. Neste contexto, é de extrema importância buscar meios de utilizá-la de forma a garantir maior eficácia e segurança. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação da bromelina na secreção (escarro) de pacientes traqueostomizados. Trata-se de um estudo experimental *in vitro*, no qual foi avaliada a ação enzimática e potencial de hemotoxicidade por meio de testes para razão de hemólise, tempo de protombina e tempo de tromboplastina parcial ativada. A interpretação das análises revelou que com o aumento da concentração de bromelina há um aumento da atividade enzimática; houve diferença significativa entre todas as concentrações testadas de bromelina e o controle positivo de hemólise; assim como não houve resultados significativos quanto ao tempo de protombina e tromboplastina. A pesquisa constituiu a base para futuros estudos, evidenciando que a bromelina apresenta altas concentrações enzimáticas e atividade proteolítica com potencial uso na prática clínica.

Palavras-chave: Bioprospecção. Bromeliaceae. Ananas. Traqueostomia.

EVALUATION OF THE PROTEOLITIC AND HEMOCYTOTOXIC ACTION OF BROMELIN ON THE SECRETION OF TRACHEOSTOMIZED PATIENTS: an *in vitro* study

ABSTRACT

Bromelain has been the subject of important research due to its immunomodulatory and nutraceutical potential. Its proteolytic capacity allows it to overcome the mucus barrier and increase the bioavailability of oral drugs or act by fluidizing the secretion produced by tracheostomized patients, facilitating its elimination. In this context, it is extremely important to find ways of using it in order to guarantee greater efficacy and safety. The aim of this study was to evaluate the action of bromelain on the secretion (sputum) of tracheostomized patients. This was an *in vitro* experimental study, in which the enzymatic action and potential for hemotoxicity were evaluated using tests for hemolysis ratio, prothrombin time and partial thromboplastin activation time. The interpretation of the analyses revealed that as the concentration of bromelain increased, there was an increase in enzymatic activity; there was a significant difference between all the concentrations of bromelain tested and the positive hemolysis control; and there were no significant results for the prothrombin and thromboplastin times. The research formed the basis for future studies, showing that bromelain has high enzymatic concentrations and proteolytic activity with potential use in clinical practice.

Keywords: Bioprospecting. Bromeliaceae. Ananas. Tracheostomy.

INTRODUÇÃO

A traqueostomia é um procedimento indicado quando há um impedimento para que a respiração siga seu trajeto natural, como por exemplo em algumas cirurgias

de cabeça e pescoço e em pacientes que precisam respirar com a ajuda de aparelhos por determinada razão (CAETANO; SANTOS, 2020). Com a pandemia de COVID-19 altamente disseminada mundialmente, conseqüentemente, infectando milhares de pessoas e provocando o agravamento dos sintomas, a traqueostomia vem sendo bastante realizada em pacientes em estado crítico como forma de facilitar a ventilação mecânica a longo prazo e, posteriormente, o desmame da ventilação (BALAKRISHNAN et al., 2020).

Visto que, a bromelina tem sido alvo de importantes pesquisas, por seu potencial imunomodulador, nutracêutico e proteolítico, ganhando espaço durante a pandemia, atraiu atenção por sua capacidade proteolítica sendo suficiente para ultrapassar a barreira de muco e aumentar a biodisponibilidade das drogas via oral e/ou atuar fluidificando a secreção produzida por pacientes traqueostomizados para facilitar sua eliminação. Desta forma, é de suma importância buscar meios de utilizá-la de forma a garantir maior eficácia e segurança (SOARES et al., 2021).

Por se tratar de uma substância que pode ser extraída do abacaxi (considerada uma das frutas com maior utilidade para a indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia) contendo propriedades antioxidantes, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, e outros, e que pode ser obtida tanto da polpa como de partes não comestíveis do abacaxi, a mesma torna-se extremamente viável para realização de diversas pesquisas, principalmente por possuir ainda, potencial anti-inflamatório e propriedades anticâncer, e funcionando ainda como um auxiliador no processo de digestão (por sua ação enzimática) e como um agente cardioprotetor (ALI et al., 2020; ZDROJEWICZ et al., 2020).

A bromelina é uma mistura proteica heterogênea com alta atividade proteolítica à base de cisteína protease (GROSS et al., 2020). O nome genérico, bromelina, é empregado a um grupo de enzimas proteolíticas achadas nos vegetais da família *Bromeliaceae*, sendo o abacaxi o mais conhecido, e inclusive, bastante consumido no Brasil, tendo diversos nutrientes e apresentando um bom custo-benefício (VIEIRA et al., 2020). Neste sentido, é uma proteína de significativa importância biológica e econômica (RAMLI et al., 2018).

A pesquisa traz como problemática: “Qual a ação proteolítica e hemocitotóxica da bromelina na secreção de pacientes traqueostomizados?”. A realização do estudo terá sua contribuição na recomendação baseada em uma experimentação científica da enzima bromelina analisada como uma alternativa

terapêutica aos medicamentos sintéticos, utilizados para fluidificar as secreções produzidas por pacientes traqueostomizados, onde em estudos futuros serão testados *in vivo*, para oferecer uma alternativa eficaz e com menos efeitos colaterais que os fármacos já utilizados.

Neste contexto, objetivou-se avaliar em estudo *in vitro* a ação da bromelina no escarro de pacientes traqueostomizados, mais especificamente, comparar a ação proteolítica da bromelina em suas diferentes concentrações na secreção traqueal e determinar a ação da bromelina e seus efeitos na hemólise e coagulação sanguínea.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Tipo de estudo e local de realização

Trata-se de um estudo experimental *in vitro*, com delineamento programado e realizado no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal, com parceria entre o laboratório de estudos funcionais e moleculares em fisiofarmacologia (LAFMOL-CCS/UFPI) e o laboratório de Bioeletroquímica (CCN/UFPI), de acordo com a disponibilidade de aparelhos para verificação dos testes.

2.2 Aspectos éticos da pesquisa

O estudo utilizou amostras biológicas humanas, e para isso, foi submetido e aprovado no comitê de ética do Centro Universitário de Ciências e Tecnologia do Maranhão (UNIFACEMA) sob parecer 5.901.121, cumprindo assim as exigências e determinações definidas dispostas na resolução 466/12, do Conselho Nacional de Saúde (CNS), que determina e regulariza as normas e diretrizes de pesquisas envolvendo seres humanos.

2.3 Matéria prima

Optou-se pela utilização da bromelina em pó isolada comercializada, devido ao fato de o material já se encontrava processado, padronizado e disponível, a fim não acarretar prejuízos ou variações na pesquisa. A bromelina em pó (C.

enzimático- 1BTU= 1.09GDU) foi adquirida da SM Empreendimentos Farmacêuticos LTDA- Rio de Janeiro (RJ), de procedência dos Estados Unidos - EUA.

2.4 Procedimento para obtenção da amostra de material biológico

O material biológico foi obtido após a aspiração de 13 (treze) pacientes adultos traqueostomizados com processos infecciosos respiratórios, mas sem registros de bactérias multirresistentes ou em uso de antibióticos, entretanto estavam hipersecretivos. O material biológico foi coletado antes da utilização de medicações que tinham ação mucolítica, sendo esse procedimento padrão dentro das unidades de terapia intensiva, após a avaliação das características respiratórias, quando os pacientes não conseguem eliminar as secreções.

As amostras de secreção de todos os pacientes adultos traqueostomizados com processos infecciosos respiratórios que estavam internados na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do hospital Casamater em Teresina-PI foram colhidas. Por se tratar de uma temática nova e pouco pesquisada, não foram incluídos pacientes com patologias adjacentes.

Para a realização do procedimento, foi necessário o uso de equipamentos de proteção individual; frasco, sonda e extensor para aspiração; torpedo com ar comprimido; copo descartável, papel toalha, entre outros. Antes do início, foi explicado o procedimento para o paciente e familiar e depois prosseguiu-se colocando o paciente em posição de semi-fowler inserindo a sonda e aspirando as secreções, oferecendo intervalos entre as aspirações para o conforto do paciente. Ao final deste procedimento, o material foi descartado em local apropriado (LYNN, 2009).

Por se tratar de material biológico de origem humana, o transporte e armazenamento seguiu os padrões sanitários definidos pela Resolução RCD nº 504, na qual, fica estabelecido que para as pesquisas ligadas a órgão governamental, não será exigido o licenciamento sanitário. Assim, o processo de transporte pode ser avaliado pelas autoridades de vigilância sanitária local competentes, caso necessário (BRASIL, 2021). As amostras foram transportadas dentro de uma embalagem primária, seguida de uma embalagem secundária e terciária rígida e resistente.

Após a aspiração dos pacientes, o material biológico foi armazenado em frascos com um número de identificação e a data da coleta. As amostras foram armazenadas em temperatura ambiente por até duas horas, após este período as

secreções foram mantidas sob refrigeração entre 2 °C e 8 °C por um tempo limite de até 12 horas (LACAN, 2014), onde verificou-se a existência de alterações das características da secreção (BRASIL, 2021). Para a realização de exames laboratoriais das amostras de secreção, foi necessário preencher uma ficha GAL (Gerenciador de Ambiente Laboratorial), porém, como o intuito do estudo foi verificar a ação proteolítica da bromelina na secreção de pacientes traqueostomizados, foi fundamental a aprovação do Comitê de Ética.

Para a realização desta pesquisa houve uma parceria entre o pesquisador e uma instituição hospitalar, que forneceu uma lista com os nomes dos pacientes traqueostomizados, internados na unidade de terapia intensiva. Por ser uma amostragem não probabilística por conveniência, não foi possível realizar cálculos para definir o tamanho da amostra, assim os participantes foram escolhidos por meio de sorteio para evitar viés, e a partir da disponibilidade da lista e do dia determinado para coleta.

Depois do processo de seleção, os pacientes foram procurados e receberam um convite verbal para participar da pesquisa. Em seguida, um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi disponibilizado e assinado por um familiar responsável, caso aceitasse ceder o material biológico para a pesquisa. O termo seguiu as normas da Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) sobre as pesquisas que envolvem seres humanos. Ressaltando que a identidade do paciente foi mantida em sigilo profissional, e o período da coleta de dados ocorreu entre os meses de dezembro de 2022 a março de 2023.

2.5 Critério de inclusão e exclusão

Como critérios de inclusão foram selecionados pacientes traqueostomizados, de ambos os sexos, que estavam internados na unidade de terapia intensiva, recebendo assistência hospitalar, onde o familiar responsável concordou e assinou o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para participação no estudo. Quanto aos critérios de exclusão, não estavam aptos para o estudo pessoas com idade inferior a 18 anos, ou que não estivessem em tratamento de infecções respiratórias com registro de bactérias multirresistentes.

2.6 Atividade enzimática

A atividade enzimática da bromelina foi baseada na metodologia de Campos (2007) na qual, destaca-se os substratos, caseína e amostra biológica (escarros), da seguinte forma: Pesou-se 0,2g de substrato de bromelina, em seguida, diluiu-se com 0,5 mL de água destilada e homogeneizou-se. Adicionou-se a essa diluição 3,0 mL de hidróxido de sódio 1M (NaOH 1M), agitou-se e em seguida adicionou-se 0,5mL de tampão fosfato de potássio (pH 7,5). Nesta mistura adicionou-se ácido clorídrico 1M (HCl 1M) em volume suficiente para se obter uma solução de pH a 7,5, por fim foi adicionada uma quantidade de água destilada suficiente para atingir 10 mL de volume final.

Pipetou-se 2,5 mL das soluções já descritas, nos tubos teste (T); nos tubos brancos (B3); 2,5 mL de solução de ácido clorídrico a 0,05M (HCl 0,05M) nos tubos branco da enzima (B1); e branco do aparelho (B2). Deixou-se esses tubos em banho-maria a 37°C por 5 minutos, então foi adicionado 0,2 mL da solução enzimática a ser testada nos tubos T (bromelina em concentração adequada para se obter uma concentração final de 10, 5, 2,5, 1, 0,5, e 0,25 mg/mL) e B1 e 0,2 mL de HCl 0,05M aos demais.

Após a mistura, incubou-se a 37°C por 10 minutos. Ao fim desse tempo se adicionou 5 mL de ácido tricloroacético 0,3M (TCA 0,3M). Deixou-se em repouso a temperatura ambiente por dez minutos para então se separar o líquido do precipitado por centrifugação a 4000 g por 10 minutos. Obtido o sobrenadante se realizou a leitura espectrofotométrica a 280 nm das soluções em questão. Através das leituras obtidas e do coeficiente de absorvidade molar da tirosina foi possível calcular a atividade enzimática da bromelina na amostra, sendo que cada amostra foi realizada em triplicata.

2.7 Potencial de hemotoxicidade

Durante a realização do estudo, os pesquisadores entenderam que seria necessário comprovar que a bromelina não apresenta potencial para hemotoxicidade e que não induz a coagulação sanguínea, evitando a formação de coágulos e possível trombose.

Para análise de hematotoxicidade, foi utilizado um método específico para avaliar a razão da hemólise, o tempo de protrombina e o tempo de tromboplastina parcial ativada, para assim, determinar a segurança do uso da bromelina. Neste ponto, todos os participantes da equipe foram convidados a participarem da pesquisa e assinaram o TCLE. As amostras de sangue foram coletadas por um profissional capacitado, e em seguida armazenadas para a realização dos testes que formaram a base para futuros testes *in vivo*.

2.7.1 Razão de Hemólise

Todo o procedimento de metodologia para a razão de hemólise da bromelina foi baseado na metodologia de Sæbø et al. (2023). Após a colheita do sangue, de preferência de indivíduos com o tipo O+, a fim de se evitar reações cruzadas, este foi centrifugado a 1.700 g por 5 minutos. Descartou-se o plasma obtido desta centrifugação e então realizam-se três lavagens dos eritrócitos com solução salina 0,9%.

Após as lavagens, pipetou-se os eritrócitos em volume suficiente de solução salina 0,9% a fim de se produzir uma suspensão a 1%. Tomou-se então 400 µL da suspensão de eritrócitos a 1% e se adicionou a 400 µL da solução a ser testada (bromelina em concentração adequada para se obter uma concentração final de 10, 5, 2,5, 1, 0,5, e 0,25 mg/mL), depois a 400 µL de salina 0,9% e por fim a 400 µL de Triton-X 10%, sendo esses dois últimos os controles negativo e positivo do teste, respectivamente.

Prosseguiu para a incubação das mesmas em banho-maria a 37°C por 60 minutos. Ao fim desse tempo, centrifugou-se as amostras em 1700 g por 5 minutos e então se transferiu 50 µL do sobrenadante para uma placa de 96 poços, para uma avaliação espectrofotométrica a 405 nm. Por meio de uma relação matemática entre a absorbância da amostra, do controle negativo e do controle positivo foi possível obter a razão da hemólise. Para esse procedimento as amostras foram dispostas em triplicatas.

2.7.2 Tempo de Protrombina

O tempo de protrombina foi baseado na metodologia de Weber et al. (2018) e na metodologia disposta na bula para o teste de tempo de protrombina da empresa LABTEST ref. 504 (Lagoa Santa, MG, Brasil), de acordo com as recomendações do fabricante. Após a coleta do sangue em tubos com citrato de sódio como anticoagulante deu-se seguimento para a centrifugação a 1000 g por 15 minutos. Transferiu-se 100 µL do plasma obtido após a centrifugação em um tubo de vidro em banho-maria a 37°C, e disso se adicionou 10 µL da solução a ser testada (bromelina em concentração adequada para se obter uma concentração final de 10, 5, 2,5, 1, 0,5, e 0,25 mg/mL) ou 10 µL de tampão fosfato de potássio pH 7,5 para funcionar como controle do experimento.

Após se adicionar a substância teste, manteve-se essa mistura em incubação a 37°C por 30 minutos, após esse período se adicionou 200 µL reagente 1 (um) do teste, composto por extrato de cérebro de coelho $\geq 2,9\%$, cloreto de sódio 105-145,5 mM, citrato de sódio 25-30 mM, e isotiazolinonas 0,1-0,35%, e se disparou um cronômetro de maneira concomitante, ao se notar a formação do coágulo o cronômetro foi parado e foi anotado o tempo de coagulação. Cada amostra foi disposta em triplicata.

2.7.3 Tempo de tromboplastina parcial ativada

Para o tempo de tromboplastina parcial ativada foi utilizada a metodologia de Weber et al. (2018) disposta na bula para o teste de tempo de tromboplastina parcial ativada da empresa LABTEST ref. 556 (Lagoa Santa, MG, Brasil). Após a coleta do sangue em tubos com citrato de sódio como anticoagulante se deu seguimento para a centrifugação a 1000 g por 15 minutos. Transferiu-se 100 µL do plasma obtido após a centrifugação em um tubo de vidro em banho-maria a 37°C, disso se adicionou 10 µL da solução a ser testada (bromelina em concentração adequada para se obter uma concentração final de 10, 5, 2,5, 1, 0,5, e 0,25 mg/mL) ou 10 µL de tampão fosfato de potássio pH 7,5 para funcionar como controle do experimento.

Após se adicionar a substância teste se manteve essa mistura em incubação a 37°C por 30 minutos, após esse período se adicionou 100 µL da Cefalina,

composta por extrato ácido elágico $<15 \mu\text{mol/L}$, cérebro de coelho desidratado $<0,20\%$, fenol $<0,4\%$, cloreto de sódio $<145,5 \text{ mmol/L}$, e $100 \mu\text{L}$ da solução de cloreto de cálcio do teste, composto por cloreto de cálcio 25 mmol/L e tiazolinonas $0,15\%$, disso disparou-se um cronômetro de maneira concomitante, ao se notar a formação do coágulo o cronômetro foi parado e foi anotado o tempo de coagulação. Nesse procedimento cada amostra também foi realizada em triplicata.

2.8 Riscos e benefícios

De modo geral, a pesquisa oferece baixo risco aos participantes, pois os mesmos já realizavam o procedimento de aspiração traqueal, porém, o procedimento em si, pode gerar desconforto, traumas na mucosa, e até mesmo infecções. Para minimizar os riscos, o procedimento de aspiração foi realizado de forma estéril, por um profissional capacitado, utilizando todos os equipamentos de proteção individual e seguindo as boas práticas de segurança e cuidado ao paciente.

Quanto aos benefícios, é visto que estes ultrapassam os riscos, pois a realização da pesquisa proporcionará a aquisição de conhecimento científico sobre o tema, possibilitando, desta forma, a inserção de novos tratamentos que visem atender as necessidades dos pacientes hospitalizados, diminuindo a necessidade de procedimentos invasivos. Outro benefício do estudo foi o aprofundamento dos conhecimentos teóricos sobre a bromelina e sua ação enzimática e proteolítica, além de poder embasar futuras pesquisas para a utilização da substância dentro do ambiente hospitalar, minimizando gastos e oferecendo tratamentos mais seguros e confortáveis para os pacientes.

2.9 Análise estatística

Os dados do experimento foram organizados no software Microsoft Excel 2019, e as análises estatísticas foram realizadas por meio do pacote estatístico SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 20.0. A distribuição normal dos dados foi submetida ao método ANOVA. Os resultados foram considerados diferentes estatisticamente utilizado o padrão de significância de 5%.

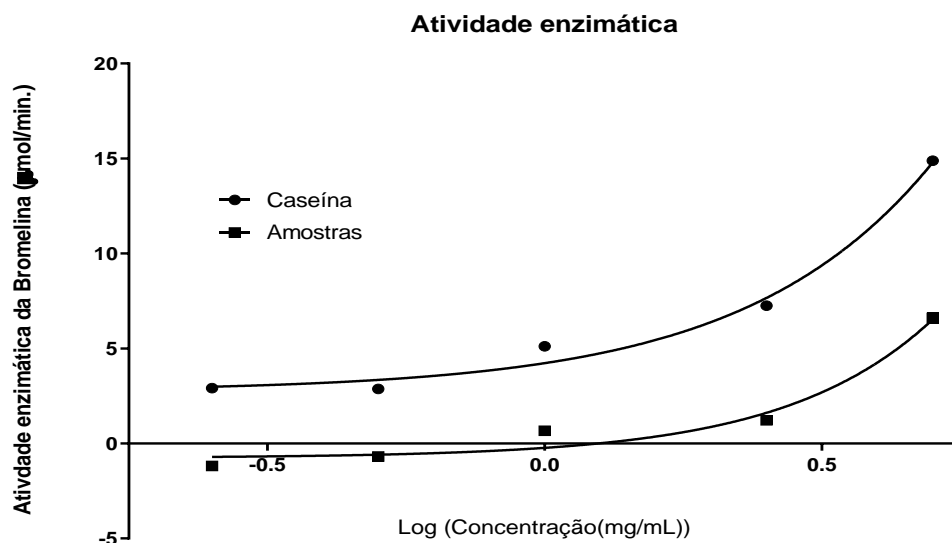
3 RESULTADOS

A apresentação dos resultados consiste na análise da atividade enzimática da bromelina e teste piloto em amostras sanguíneas.

3.1 Ação enzimática e hemolítica da bromelina

Para determinar a ação enzimática da bromelina foram utilizados diferentes métodos que possibilitaram atingir os objetivos definidos, inicialmente determinou-se a atividade enzimática da bromelina, na qual as análises foram feitas em triplicatas, os dados obtidos podem ser observados na figura 4.

Figura 4: Avaliação da atividade enzimática da bromelina isolada por minuto em diferentes concentrações de bromelina sobre amostras de secreções biológicas.

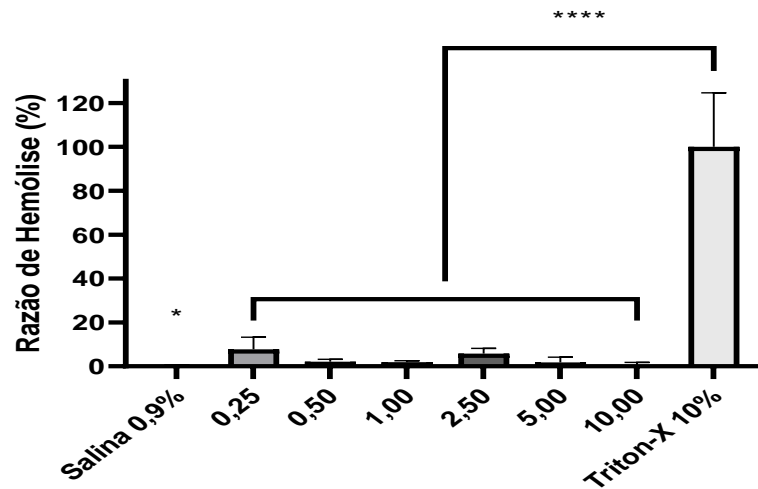


Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

Nota-se que com o aumento da concentração de bromelina houve um aumento da atividade da mesma nas amostras de caseína e biológicas, onde os testes obtiveram resultados estatisticamente significativos.

Quanto as análises em amostras sanguíneas, para determinar a hemotoxicidade da substância testada, foi realizado a razão de hemólise, uma vez que, a observação de hemólise está diretamente relacionada a indução de danos para essas células em questão (Figura 5).

Figura 5: Análise da Razão de Hemólise em testes *in vitro* em diferentes concentrações de bromelina.

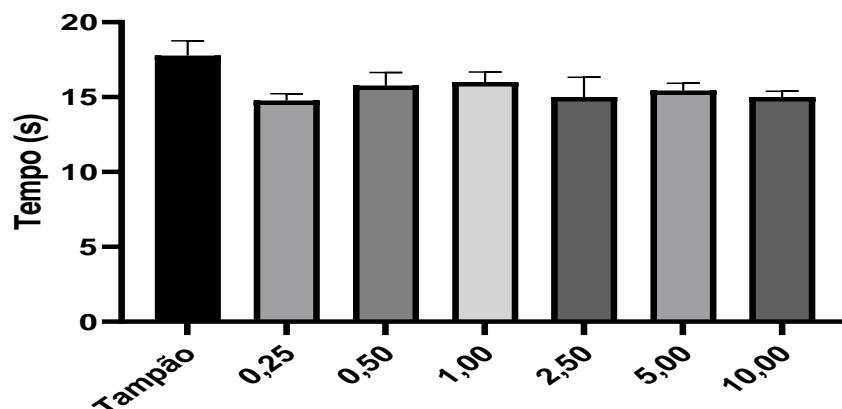


Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

A análise revelou que houve diferença significativa entre todas as concentrações testadas de bromelina e o controle positivo de hemólise, Triton-X 10%, além de não haver diferença entre o controle negativo, salina 0,9%, e os grupos com bromelina. Isso indica que a bromelina não induz hemólise de maneira significativa.

Com relação ao teste de tempo de protrombina, para avaliar a capacidade sanguínea para coagulação, não foram observadas diferenças significativas entre o grupo Tampão e os grupos que receberam bromelina em diferentes concentrações (Figura 6).

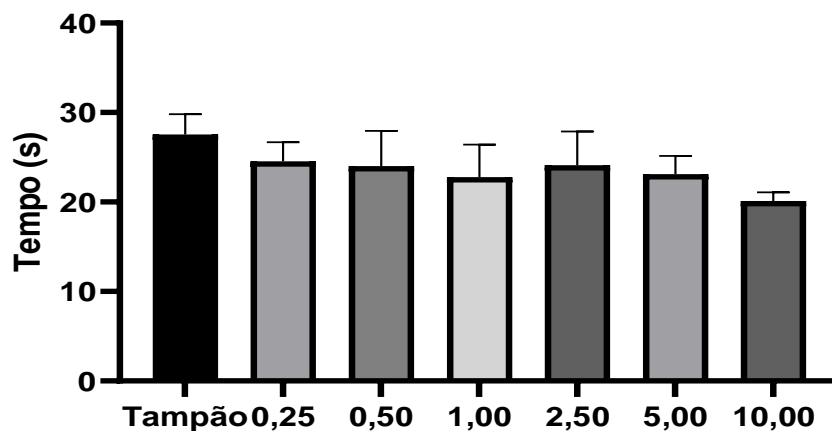
Figura 6. Representação do tempo de Protrombina conforme escores e média de tempo em diferentes concentrações de bromelina.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

No teste do tempo de tromboplastina parcial ativada, utilizado para identificar anormalidades no tempo de coagulação, não se observou diferença significativa quanto ao tempo de tromboplastina parcial ativada entre o grupo Tampão e os demais grupos que receberam bromelina em quaisquer concentrações (Figura 7).

Figura 7. Análise do tempo de tromboplastina parcial ativada conforme medida de tempos e escores em diferentes concentrações de bromelina.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

4 DISCUSSÃO

Contudo, a literatura acerca da estabilidade da bromelina indica que esta apresenta uma resistência ao calor por um curto período, e ainda, que fatores como a exposição a luz e mau condicionamento podem interferir na capacidade proteolítica da bromelina (ABREU, 2019).

O muco do trato respiratório é complexo, sendo uma mistura secretada por células caliciformes epiteliais, de modo geral é formado por camadas de sal e gel, separados por um filme surfactantes na interface ar-líquido, cerca de 95-99% são formados por água e o restante por mucina que contém pequenas quantidades de sais, enzimas e antienzimas, oxidantes e antioxidantes, secreções antibacterianas endógenas, entre outros compostos. Neste ponto, observa-se que tanto a composição como a concentração da mucina no muco são fatores que influenciam na viscosidade cinemática do mesmo (GARCÍA-DÍAZ *et al.*, 2018). Assim, a mucina

presente na secreção é área de interesse quando se trata de um mecanismo proteolítico de uma determinada substância (MURGIA *et al.*, 2018).

Quanto à realização dos testes para avaliar os efeitos da bromelina na coagulação sanguínea e sua toxicidade, foi observado que a substância não apresentou influência nas amostras analisadas, não gerando alterações ou nenhum resultado significativo. Entretanto, há evidências que comprovam que o uso da bromelina tem potencial anticoagulante, podendo atuar benéficamente sobre distúrbios relacionados ao sangue (HIKISZ; BERNASINSKA-SLOMCZEWSKA, 2021) e não apresentando potencial para provocar intoxicação sanguínea ou de outro tipo (VARILLA *et al.*, 2021).

Uma explicação para tal fato é que a enzima pode atuar sobre as hemácias humanas, revelando um efeito estabilizador na membrana celular dos eritrócitos, apresentando tendência a diminuir a viscosidade do interior da célula e a fluidez da membrana celular, melhorando as propriedades reológicas dos glóbulos vermelhos (GWOZDZINSKI *et al.*, 2023), o que apoia que há efeitos benéficos da bromelina no tratamento de doenças cardiovasculares, podendo atuar como coadjuvantes na proteção das hemácias contra a eritropatia e outras patologias (HIKISZ; BERNASINSKA-SLOMCZEWSKA, 2021).

Neste ponto, Errasti *et al.* (2016) discorrem que a bromelina prolonga o tempo de protrombina (PT) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT) provocando a inibição da ativação de vias intrínsecas e extrínsecas, evitando que coágulos sejam formados. Isso também é mostrado no estudo de Hu *et al.* (2022), que investigaram os efeitos da bromelina na desregulação da coagulação sanguínea induzida pela doença hepática gordurosa não alcoólica, destacando que o tratamento com a substância atenuou a desregulação da coagulação sanguínea, o que pode estar relacionado ao tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial e outros fatores que evitaram a formação de trombo no fígado, sugerindo que a bromelina tem efeitos anticoagulantes contra a desregulação induzida pela ativação da cascata de coagulação.

Deve-se ressaltar ainda que, estudos anteriores apontaram que os mecanismos dos efeitos anticoagulantes da bromelina podem estar ligados à sua atividade proteolítica que provoca a quebra da fibrina ou distúrbio na ativação das vias de coagulação (HU *et al.*, 2020). Porém, os mecanismos moleculares exatos que

envolvem a ação da bromelina sobre a coagulação sanguínea ainda não são totalmente conhecidos (HU *et al.*, 2022).

5 CONCLUSÃO

Por fim, os dados obtidos nos testes *in vitro* constataram relação direta entre a concentração e a atividade enzimática da bromelina sobre amostras biológicas, o que está em sintonia com outros estudos que apontam os benefícios da substância, para tal, a pesquisa realizou ainda, testes para avaliar a capacidade de coagulação e hemotoxicidade da bromelina, comprovando sua segurança para futuras pesquisas *in vivo*.

A pesquisa contribuiu para a ciência uma vez que traz evidências de que a bromelina apresenta atividade proteolítica, oferecendo uma alternativa viável para o tratamento de condições respiratórias, constituindo também a base para futuros estudos.

ARTIGO 2

AVALIAÇÃO DA BROMELINA QUANTO A VISCOSIDADE DA SECREÇÃO DE PACIENTES TRAQUEOSTOMIZADOS: UM ESTUDO IN VITRO

O artigo desenvolvido apresenta a produção científica sobre os testes in vitro realizados com a bromelina quanto a viscosidade da secreção de pacientes traqueostomizados, submetido e formatado na revista Interfaces - Saúde, Humanas e Tecnologia (Qualis A3). O periódico foi escolhido devido a sua relevância no meio acadêmico, possibilitando que o material seja compartilhado com um maior número de pesquisadores e estimulando a realização de estudos posteriores.

AVALIAÇÃO DA BROMELINA QUANTO A VISCOSIDADE DA SECREÇÃO DE PACIENTES TRAQUEOSTOMIZADOS: UM ESTUDO *IN VITRO*

EVALUATION OF BROMELINE FOR SECRETION VISCOSITY IN TRACHEOSTOMIZED PATIENTS: AN *IN VITRO* STUDY

Eduardo Henrique Barros Ferreira; Daniel Dias Rufino Arcanjo; José Otávio Carvalho Sena de Almeida; Rômulo José Vieira; Ney Rômulo de Oliveira Paula

Resumo

Com a pandemia de COVID-19, o procedimento de traqueostomia vem sendo bastante realizado em pacientes em estado crítico como forma de facilitar a ventilação mecânica a longo prazo e o desmame da ventilação. Diante dessa situação, diversos estudos relatam sobre a função mucolítica da bromelina, já que ela é uma enzima com a capacidade de facilitar a diluição de muco. O estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* a ação da bromelina na viscosidade do escarro de pacientes traqueostomizados. Trata-se de um estudo experimental *in vitro*, com delineamento programado e realizado no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal. De acordo com os resultados obtidos, não foi identificada diferença significativa quanto a viscosidade entre o grupo basal e os grupos que receberam bromelina em quaisquer concentrações. Inicialmente, observa-se que os mucos adquiridos como amostras apresentam viscosidades distintas, pois apesar da escolha dos pacientes ser baseada nas características clínicas semelhantes, cada organismo produz muco do trato respiratório distintos, cujas propriedades dependem dos fatores internos e externos. Portanto, mesmo não termos verificados resultados significativos na redução da viscosidade das secreções dos pacientes traqueostomizados, a pesquisa constituiu a base para futuros estudos na linha de investigação do potencial enzimático e proteolítico da bromelina.

Palavras-chave: Bioprospecção; *Bromeliaceae*; Traqueostomia.

Abstract

With the COVID-19 pandemic, the tracheostomy procedure has been widely performed in critically ill patients as a way to facilitate long-term mechanical ventilation and weaning from this ventilation. Faced with this situation, several studies report on the mucolytic function of bromelain, since it is an enzyme capable of facilitating the dilution of mucus. The objective of the study was to evaluate *in vitro* the action of bromelain on sputum viscosity in tracheostomized patients. This is an experimental *in vitro* study, with a programmed design and carried out in the Graduate Program in Biotechnology in Human and Animal Health. According to the results obtained, no significant difference was identified in terms of viscosity between the baseline group and the groups that received bromelain at any concentration. Initially, it is observed that the mucus acquired as samples have different viscosities, because despite the choice of patients being based on similar clinical characteristics, each organism produces mucus from the respiratory tract, whose properties depend on internal and external factors. Therefore, even though we did not verify significant results in reducing the viscosity of the secretions of tracheostomized patients, the research formed the basis for future

studies, showing that bromelain has high enzymatic concentrations and proteolytic activity.

Keywords: Bioprospecting; *Bromeliaceae*; Tracheostomy.

INTRODUÇÃO

Sendo um procedimento cirúrgico que permite a abertura da traqueia, a traqueostomia tem como objetivo oferecer suporte ventilatório prolongado ao paciente ou auxiliá-lo no desmame do suporte ventilatório; favorecer a aspiração e higiene das vias respiratórias; e impedir complicações da intubação prolongada, como a estenose subglótica (PIAZZA *et al.*, 2020). A traqueostomia pode ser permanente, quando o paciente precisa de ventilação definitiva, ou temporária, quando há a possibilidade de ser revertida. Essa indicação depende do quadro do paciente, de suas condições físicas, da situação da pele ao redor da incisão, entre outros fatores (CAETANO; SANTOS, 2020).

De acordo com Zapata-Contreras, Hoyos-Cuervo e Florian-Perez (2019), as indicações clínicas da traqueostomia incluem obstrução das vias aéreas superiores, necessidade de ventilação mecânica prolongada ou proteção das vias aéreas, dificuldade de realização do desmame da ventilação mecânica, polineuropatia e escore de coma de Glasgow persistente < 8. Quanto à finalidade, as traqueostomias podem ser preventivas, curativas e paliativas. As preventivas são aquelas realizadas para complementar procedimentos cirúrgicos que possam gerar obstruções das vias aéreas; as curativas têm como objetivo manter a via aérea do paciente pérvia; já as paliativas são indicativas para diminuir o desconforto respiratório dos pacientes em situação terminal (CAETANO; SANTOS, 2020).

Com a pandemia de COVID-19, e, conseqüentemente, o aumento do número de pessoas infectadas e o agravamento dos sintomas, a traqueostomia vem sendo bastante realizada em pacientes em estado crítico como forma de facilitar a ventilação mecânica a longo prazo e o desmame da ventilação (BALAKRISHNAN *et al.*, 2020). Diante da situação, diversos estudos relatam sobre a função mucolítica da bromelina, já que ela é uma enzima com a capacidade de facilitar a diluição do muco por meio da quebra de ligações de peptídeos, tendo significativa ação no sistema respiratório (PASSALI *et al.*, 2018; SOARES *et al.*, 2021).

A bromelina apresenta potencial para tratar alergias e doenças paranasais, sendo adequada para uso nas vias aéreas superiores. A enzima possui ainda, características antibacterianas contra algumas bactérias como, por exemplo, a *Enterococcus faecalis*, podendo ser uma alternativa a fármacos já utilizados. Neste aspecto, a bromelina tem aplicação em diversas áreas da saúde, entre elas, a odontologia, com seu potencial para ser usada na irrigação endodôntica (MAVANI *et al.*, 2020). A mesma pode ser utilizada ainda como alternativa a anti-inflamatórios não esteroides, pois apresentam menor risco de gerar reações adversas (MENDES *et al.*, 2019).

Ainda sobre sua ação mucolítica, nota-se que a mesma tem importante ação no sistema respiratório, pois muitas patologias respiratórias provocam excesso de muco e inflamação, neste sentido, a bromelina é uma enzima capaz de facilitar a fluidificação do muco através da quebra de ligações de peptídeos, além de possuir características anti-inflamatórias, potencial para atenuar a tempestade de citocinas ocasionada pela infecção por COVID-19 e ação imunomoduladora (SOARES *et al.*, 2021).

Neste sentido, as pesquisas têm buscado alternativas terapêuticas aos medicamentos sintéticos, utilizados para fluidificar as secreções produzidas por pacientes traqueostomizados, onde em estudos futuros serão testados *in vivo*, para oferecer um fármaco eficaz e com menos efeitos colaterais que os medicamentos já utilizados.

Assim, a pesquisa traz como problemática “Qual a eficácia da bromelina na redução da viscosidade da secreção de pacientes traqueostomizados?”. Neste contexto, objetivou-se avaliar em estudo *in vitro* a ação da bromelina na viscosidade do escarro de pacientes traqueostomizados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Tipo de estudo e local de realização

Trata-se de um estudo experimental *in vitro*, com delineamento programado e realizado no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal, com parceria entre o laboratório de estudos funcionais e moleculares em

fisiofarmacologia (LAFMOL-CCS/UFPI) e o laboratório de Bioeletroquímica (CCN/UFPI).

Aspectos éticos da pesquisa

O estudo utilizou amostras biológicas humanas, e para isso, foi submetido e aprovado no comitê de ética do Centro Universitário de Ciências e Tecnologia do Maranhão (UNIFACEMA) sob parecer 5.901.121, cumprindo assim as exigências e determinações definidas dispostas na resolução 466/12, do Conselho Nacional de Saúde (CNS), que determina e regulariza as normas e diretrizes de pesquisas envolvendo seres humanos.

Princípio ativo: bromelina

Optou-se pela utilização da bromelina em pó isolada comercializada, devido ao fato de o material estar disponível, padronizado e certificado e não acarretar prejuízos ou variações ao longo da pesquisa. A bromelina em pó (C. enzimático-1BTU= 1.09GDU) foi adquirida por meio do site da SM Empreendimentos Farmacêuticos LTDA- Rio de Janeiro (RJ), de procedência dos Estados Unidos - EUA.

Procedimento para obtenção da amostra de material biológico

O material biológico foi obtido após a aspiração de 13 (treze) pacientes traqueostomizados com processos infecciosos respiratórios, mas sem registros de bactérias multirresistentes ou em uso de antibióticos, entretanto estavam hipersecretivos. O material biológico foi coletado antes da utilização de medicações que possuíssem ação mucolítica, sendo esse procedimento padrão dentro das unidades de terapia intensiva, após uma avaliação das características respiratórias, quando os clientes não conseguem eliminar naturalmente as secreções.

As amostras de secreção de todos os pacientes adultos traqueostomizados com processos infecciosos respiratórios que estavam internados na UTI do hospital Casamater em Teresina-PI foram colhidas. Por se tratar de uma temática nova e pouco pesquisada, não foram incluídos pacientes com patologias adjacentes.

Para a realização deste procedimento, foi necessário o uso de equipamentos de proteção individual; frasco, sonda e extensor para aspiração; torpedo com ar comprimido; copo descartável, papel toalha, entre outros. Antes do início, foi explicado o procedimento para o paciente e familiar e depois prosseguiu-se colocando o paciente em posição semi-fowler, inserindo a sonda e aspirando as secreções, oferecendo intervalos entre as aspirações para o conforto do paciente, ao final, o material foi descartado em local apropriado (LYNN, 2009).

Por se tratar de material biológico de origem humana, o transporte e armazenamento seguiu os padrões sanitários definidos pela Resolução RCD nº 504, na qual, fica estabelecido que para as pesquisas ligadas a órgão governamental, não o licenciamento sanitário. Assim, o processo de transporte pode ser avaliado pelas autoridades de vigilância sanitária local competentes, caso necessário (BRASIL, 2021). As amostras foram transportadas dentro de uma embalagem primária, seguida de uma embalagem secundária e terciária rígida e resistente.

Após a aspiração do material mucoso dos pacientes, o material biológico foi armazenado em frascos com um número de identificação e a data da coleta. As amostras foram armazenadas em temperatura ambiente por até duas horas, após este período as secreções foram acondicionadas sob refrigeração entre 2 °C e 8 °C por um tempo limite de até 12 horas (LACAN, 2014). Durante esse intervalo verificou-se a existência de alterações das características da secreção (BRASIL, 2021). Para a realização de exames laboratoriais das amostras de secreção, foi necessário preencher uma ficha GAL (Gerenciador de Ambiente Laboratorial), porém, como o intuito do estudo foi verificar a ação proteolítica da bromelina na secreção de pacientes traqueostomizados, foi fundamental a aprovação do Comitê de Ética.

Para a realização desta pesquisa houve uma parceria entre o pesquisador e o hospital Casamater em Teresina-PI que forneceu uma lista com os nomes dos pacientes traqueostomizados, internados na unidade de terapia intensiva, seguindo os preceitos da Lei Geral de Proteção de Dados Pessoais nº 13.709/2018 (BRASIL, 2018). Por ser uma amostragem não probabilística por conveniência, os participantes foram escolhidos por meio de sorteio para evitar viés, e a partir da disponibilidade da lista e do dia determinado para coleta.

Depois do processo de seleção, os pacientes foram procurados e receberam um convite verbal para participar da pesquisa. A seguir, um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi disponibilizado e assinado por um familiar

responsável, caso aceitasse ceder o material biológico para a pesquisa. O termo seguiu as normas da Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) sobre as pesquisas que envolvem seres humanos. Ressaltando que a identidade do paciente é mantida em sigilo profissional, e o período da coleta de dados ocorreu entre os meses de dezembro de 2022 a março de 2023.

Critérios de inclusão e exclusão

Como critérios de inclusão foram selecionados pacientes traqueostomizados, de ambos os sexos, que estavam internados na unidade de terapia intensiva, recebendo assistência hospitalar, onde houve concordância do familiar responsável, que posteriormente assinou o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para participação no referido estudo. Quanto aos critérios de exclusão, não estavam aptos para o estudo pessoas com idade inferior a 18 anos, ou que estivessem em tratamento de infecções respiratórias com registro de bactérias multirresistentes.

Teste de viscosidade

A fim de verificar a ação da bromelina em pó isolada em relação à consistência das secreções pulmonares coletadas dos doadores foram medidos os valores de viscosidade cinemática de cada secreção sem e com a bromelina em diferentes concentrações (0,25; 0,50; 1,00; 2,50; 5,00 e 10,00 mg/mL de secreção). Para isto, foi utilizado um viscosímetro rotacional MVD5, marca Marte, equipados com *spindles* com diferentes áreas de contato, as quais representam uma determinada faixa de viscosidade do fluido.

Neste estudo, foram utilizados *spindles* com duas áreas de contato diferentes, sendo estas capazes de quantificar a viscosidade até 1000 mPa.s (SPL01) e 5000 mPa.s (SPL02). Sendo apenas a secreção 3 que foi mensurada utilizando o SPL02, cuja escolha dependeu da aparência do material como também do valor do percentual de torque, que esteve dentro da faixa de 20 a 90%, na qual representava o menor erro relativo experimental.

A temperatura ambiente estava em 25° C e a velocidade de rotação variou entre 6.0 e 12.00 *g* dependendo do valor do percentual de torque. Para medir a

viscosidade foi utilizado cerca de 30 mL de amostra, começando com amostra branca contendo uma baixa concentração de bromelina, seguido com amostras com maiores concentrações de bromelina dissolvida. O branco e cada concentração da bromelina em pó presentes nas três secreções diferentes foram medidas em triplicatas.

Riscos e benefícios

De modo geral, a pesquisa oferece baixo risco aos participantes, pois os mesmos já realizavam o procedimento de aspiração traqueal, porém, o procedimento em si, pode gerar desconforto, traumas na mucosa, e até mesmo infecções. Para minimizar os riscos, o procedimento de aspiração foi realizado de forma estéril, por um profissional capacitado, utilizando todos os equipamentos de proteção individual e seguindo as boas práticas de segurança e cuidado ao paciente.

Quanto aos benefícios, é visto que estes ultrapassam os riscos, pois a realização da pesquisa proporcionará a aquisição de conhecimento científico sobre o tema, possibilitando, desta forma, a inserção de novos tratamentos que visem atender as necessidades dos pacientes hospitalizados, diminuindo a necessidade de procedimentos invasivos. Outro benefício do estudo é o aprofundamento dos conhecimentos teóricos sobre a bromelina e sua ação enzimática e proteolítica, além de poder embasar futuras pesquisas para a utilização da substância dentro do ambiente hospitalar, minimizando gastos e oferecendo tratamentos mais seguros e confortáveis para os pacientes.

Análise estatística

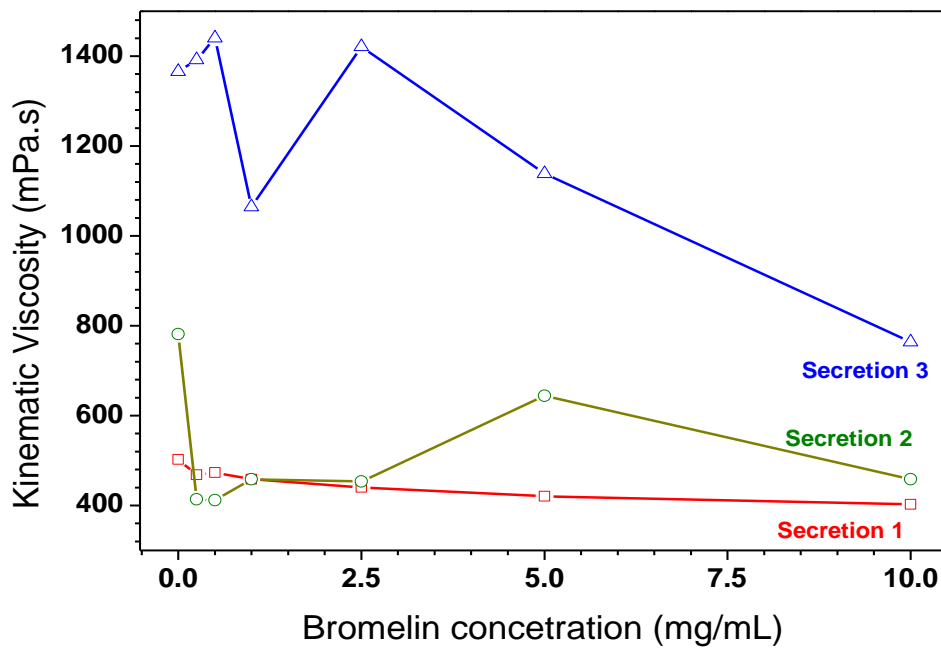
Os dados do experimento foram organizados no software Microsoft Excel 2019, e as análises estatísticas foram realizadas por meio do pacote estatístico SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 20.0 com nível de significância de 5%. A distribuição normal dos dados foi submetida ao método ANOVA.

RESULTADOS

Em relação ao teste de viscosidade, a análise da ação proteolítica da bromelina foi investigada através de três amostras de secreção traqueal (visando a

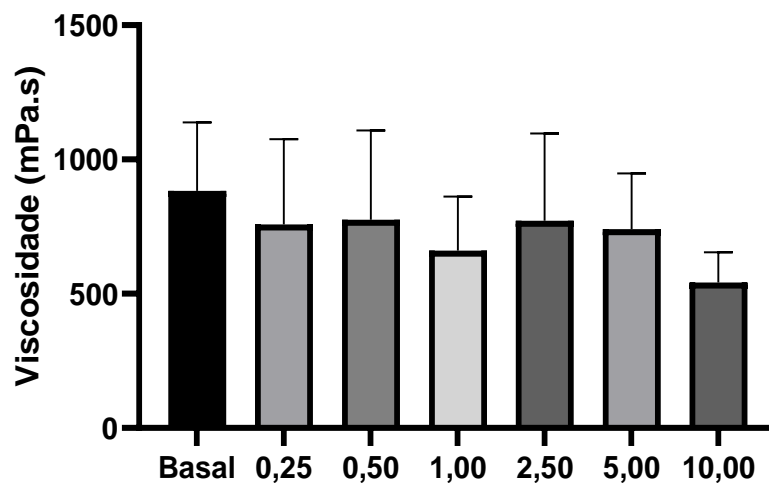
formação de triplicatas), coletadas de pacientes traqueostomizados distintos. A variação da viscosidade cinemática em relação à concentração de bromelina está apresentada na Figura 8 e 9.

Figura 8. Representação dos valores de viscosidade cinemática em diferentes secreções de muco pulmonar após adição de variadas concentrações de extrato de bromelina em pó, divididos em amostra 1, 2 e 3.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Figura 9. Análise de viscosidade das secreções do muco pulmonar em diferentes concentrações de Bromelina.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Quanto aos resultados, apesar do efeito obtido, não foi identificada diferença estatisticamente significativa quanto a viscosidade entre o grupo basal e os grupos que receberam bromelina em quaisquer concentrações em comparação a medida padrão. Inicialmente, observa-se que os mucos adquiridos como amostras apresentam viscosidades distintas, pois, apesar da escolha dos pacientes ser baseada nas características clínicas semelhantes, cada organismo produz muco do trato respiratório distintos, cujas propriedades dependem dos fatores internos e externos.

DISCUSSÃO

O muco do trato respiratório é complexo, sendo uma mistura secretada por células caliciformes epiteliais, de modo geral é formado por camadas de sal e gel, separados por um filme surfactantes na interface ar-líquido, cerca de 95-99% são formados por água e o restante por mucina que contém pequenas quantidades de sais, enzimas e antienzimas, oxidantes e antioxidantes, produtos bacterianos exógenos e secreções antibacterianas endógenas, entre outros compostos. Uma vez que tanto a composição como a concentração da mucina no muco são fatores que influenciam na viscosidade cinemática do mesmo (GARCÍA-DÍAZ *et al.*, 2018), sua presença na secreção é área de interesse quando se trata de um mecanismo proteolítico de uma determinada substância (MURGIA *et al.*, 2018).

Contudo, a presente pesquisa não mostrou resultados significativos da ação da bromelina na viscosidade das secreções traqueais, pois mesmo buscando por pacientes com semelhanças clínicas, as características e fatores individuais podem ter influenciado na ação da bromelina.

Em oposição ao resultado obtido, Pillai *et al.* (2023) demonstraram no seu estudo o efeito mucolítico da bromelina em dois modelos de escarro, onde a terapêutica com a substância bromelina evidenciou uma queda acentuada na viscosidade em ambos os grupos de tratamento (0,125 e 250 µg/mL): 27 e 36%, respectivamente. Em outra pesquisa, Ahmed *et al.* (2020) demonstraram que ao comparar a bromelina como uma outra enzima chamada zingibaína, a bromelina apresentou maior capacidade para influenciar na viscosidade de uma substância, mesmo em diferentes concentrações.

Estudos também demonstraram que a bromelina é capaz de reduzir o nível de biomarcadores imunológicos, diminuindo a produção do muco, uma vez que o nível elevado de linfócitos e neutrófilos inicia uma cascata de eventos nos pulmões facilitando a secreção de citocinas, endossando ainda mais a produção de muco, ações inflamatórias e condições edematosas. Os autores Sharma, Gupta e Pandey (2022) ao investigarem as perspectivas pré-clínicas da administração nasal de bromelina em modelos animais, relataram uma diminuição significativa na contagem total de leucócitos, linfócitos e nível de neutrófilos, enfatizando a redução da inflamação dos pulmões.

De acordo com Reis *et al.* (2022), a bromelina consegue influenciar na viscosidade do muco devido ao seu potencial para quebrar as ligações peptídicas do esqueleto de aminoácidos presentes na mucina, no qual após a fragmentação das estruturas da mucosa, as partículas reduzem a viscosidade do muco.

CONCLUSÃO

As diferentes concentrações de bromelina utilizadas neste estudo não influenciaram significativamente na redução do parâmetro viscosidade de secreção em pacientes traqueostomizados.

Apesar de não termos apresentado resultados significativos na redução da viscosidade das secreções dos pacientes traqueostomizados, a pesquisa constituiu a base para futuros estudos, principalmente no que tange a avaliação da bromelina quanto a sua concentração enzimática e atividade proteolítica. Neste sentido, é fundamental a realização de futuras pesquisas para determinar as concentrações necessárias para obter efeito mucolítico.

A enzima bromelina apresenta grande potencial para atuar em diversas áreas da saúde, onde suas atividades farmacológicas variadas que permitem seu uso no tratamento de diversas patologias, por isso, os estudos da sua estrutura e atividades possibilitam a projeção de fármacos com potencial significativo.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A bromelina apresenta atividades farmacológicas variadas que permitem seu uso em diferentes situações, por isso, os estudos da sua estrutura e atividades enzimáticas possibilitam a projeção de fármacos com potencial significativo na área da saúde.

A análise dos dados obtidos nos testes *in vitro* constataram que o aumento da bromelina era proporcional ao aumento da atividade enzimática em sintonia com outros estudos que apontam os benefícios da substância, para tal, a pesquisa realizou ainda, testes para avaliar a capacidade de coagulação e hemotoxicidade da bromelina, sugerindo sua segurança para futuras pesquisas *in vivo*.

Apesar da pesquisa não ter apresentado resultados significativos na redução da viscosidade das secreções dos pacientes traqueostomizados, a pesquisa constituiu a base para futuros estudos, evidenciando que a bromelina apresenta altas concentrações enzimáticas e atividade proteolítica, neste sentido, é fundamental a realização de futuras pesquisas para determinar as concentrações necessárias para obter efeito mucolítico e demais benefícios e potencialidades.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, D. C. A. **Desenvolvimento De Membranas De Afinidade Para A Separação De Bromelina**. 2019. 88f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/30080>. Acesso em: 21 jul 2023.
- AGOSTINI, A. D.; TAWFIK, E.; CAMPANA, A. Quantitative post-coital test: sperm counts in cervical mucus after enzymatic liquefaction. **Human Reproduction**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 311-317, 1 fev. 1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8671216/>. Acesso em: 21 maio 2021.
- ALI, M. M. et al. Pineapple (Ananas comosus): A comprehensive review of nutritional values, volatile compounds, health benefits, and potential food products. **Food Research International**, [S.I.], v. 137, p. 1-13, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996920307006>. Acesso em: 21 maio 2021.
- ALMEIDA, M. M. B. et al. Avaliação de macro e microminerais em frutas tropicais cultivadas no nordeste brasileiro. **Food Science and Technology**, [S.I.], v. 29, n. 3, p. 581-586, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612009000300020>. Acesso em: 24 maio 2021.
- ALVES, G.E. et al. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 224-1229, 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/Qw4msZB9DH9qjfZyjNP4DhL/?lang=pt>. Acesso em: 21 jun. 2021.
- AHMED, T. et al. Extraction, characterization and molecular structure of bovine skin gelatin extracted with plant enzymes bromelain and zingibain. **Journal of food science and technology**, v. 57, n.10, 3772–3781, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32903957/>. Acesso em: 24 maio 2023.
- ARSHAD, Z. I. M. et al. Bromelain: an overview of industrial application and purification strategies. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.I.], v. 98, n. 17, p. 7283-7297, 26 jun. 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-014-5889-y>. Acesso em: 20 maio 2021.
- ATAÍDE, J. A. et al. In vitro performance of free and encapsulated bromelain. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 10195, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33986357/>. Acesso em: 31 ago. 2023.
- AZARKAN, M. et al. Stem Bromelain Proteolytic Machinery: Study of the Effects of its Components on Fibrin (ogen) and Blood Coagulation. **Protein and peptide letters**, v. 2, n. 11, p. 1159–1170, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32484078/>. Acesso em: 28 mar. 2023.

BALAKRISHNAN, K. et al. COVID-19 Pandemic: What Every Otolaryngologist-Head and Neck Surgeon Needs to Know for Safe Airway Management. **Otolaryngol Head Neck Surg**, [S.l.], v. 162, n. 6, p. 804-808, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32286909/>. Acesso em: 24 maio 2021.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 504, de 27 de maio de 2021**. Dispõe sobre as Boas Práticas para o transporte de material biológico humano. Brasília: Ministério da Saúde, 2021. Disponível em: <https://cvs.saude.sp.gov.br/zip/RDC%20504%2021.pdf>. Acesso em: 9 nov. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60p. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf. Acesso em 26 de maio 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 466, de 12 de dezembro de 2012. **Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. Disponível em: <https://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2012/Reso466.pdf>. Acesso em 26 de maio de 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 190 p. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_programa_nacional_plantas_medicinais_fitoterapicos.pdf. Acesso em 26 de maio 2021.

BULLIDO-GÓMEZ DE LAS HERAS, E. et al. Traqueostomías quirúrgicas en pacientes ingresados en cuidados intensivos durante la pandemia de COVID 19 En el Hospital Central de la Defensa «GÓMEZ ULLA». Madrid. Spain. **Sanid. mil.**, Madri, v. 76, n. 4, p. 254-258, 2020. Disponível em: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1887-85712020000400254. Acesso em: 25 maio 2021.

CAETANO, L. O.; SANTOS, M. P. O. Descrição das competências do enfermeiro frente à pessoa com traqueostomia. **Revista Projeção Saúde e Vida**, [S.l.], v. 1, n. 2, p. 62-7, 2020. Disponível em: <http://revista.faculdadeprojecao.edu.br/index.php/Projecao6/article/view/1565>. Acesso em: 24 maio 2021.

CAMPOS, E. S. **Purificação e Caracterização de Bromelina a Partir do Extrato Bruto de Ananas comosus por Adsorção em Leito Expandido**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP, 2007. Disponível em: <https://www.repositorio.unicamp.br/acervo/detalhe/392228>. Acesso em: 24 maio 2021.

CAMPOS, S. C. et al. Toxicidade de espécies vegetais. **Revista Brasileira De Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 373–382, 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbpm/a/LYfYqbr4vBXgGXfxxcqZqt/>. Acesso em: 24 maio 2021.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—10th ed., **CLSI document M07-A10**. Wayne, PA, 2015.

CRICOTIROTOMÍA, Traqueotomía Percutánea y Quirúrgica en el manejo de la Vía Aérea. **Anestesiari**, 2016. Disponível em: <https://anestesiari.org/2016/cricotirotoni%C2%ADa-traqueotomi%C2%ADa-percutanea-quirurgica-manejo-la-vi%C2%ADa-aerea-revision-2015/>. Acesso em: 26 maio 2021.

DE FIGUEREDO, C. A.; GURGEL, I. G. D.; GURGEL JUNIOR, G. D. A Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. **Physis Revista de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v.24, n.2, p.381-400, 2014. Disponível em: <https://www.scielosp.org/pdf/physis/2014.v24n2/381-400/pt>. Acesso em 26 de maio 2021.

DE LENCASTRE NOVAES, L. C. et al. Stability, purification, and applications of bromelain: a review. **Biotechnology Progress**, [S.l.], v. 32, n. 1, p. 5-13, 17 nov. 2015. Disponível em: <https://aiche.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/btpr.2190>. Acesso em: 22 maio 2021.

DASGUPTA, A.; BERNARD, D. W. Herbal Remedies: Effects on Clinical Laboratory Tests. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 130, n. 4, p. 521–528, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16594744/>. Acesso em: 21 ago. 2023.

ERRASTI, M. E. et al. Effects on fibrinogen, fibrin, and blood coagulation of proteolytic extracts from fruits of *Pseudananas macrodentes*, *Bromelia balansae*, and *B. hieronymi* (Bromeliaceae) in comparison with bromelain. **Blood Coagul. Fibrinolysis**, v. 27, p. 441–449, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26886361/>. Acesso em: 18 maio 2021.

FEITOSA, M. H. A. et al. Inserção do Conteúdo Fitoterapia em Cursos da Área de Saúde. **Rev. bras. educ. med.**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 2, p. 197-203, jun. 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbem/a/Rmbg6DyCvzvC85yLrqnX3bS/?lang=pt>. Acesso em: 18 maio 2021.

FURKIM, A. M.; SANTINI, C. R. Q. S. **Disfagia Orofaríngeas**. ed. 1. São Paulo: Pró-Fono, 2008.

GARCÍA-DÍAZ, M. et al. The role of mucus as an invisible cloak to transepithelial drug delivery by nanoparticles. **Adv Drug Deliv Rev.**, v.15, n.124, p.107-124, 2018. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29117511/> >. Acesso em: 05 julho 2023.

GUTIÉRREZ-JIMÉNEZ, J.; ARCINIEGA, I.; NAVARRO-GARCÍA, F. The serine protease motif of Pic mediates a dose-dependent mucolytic activity after binding to sugar constituents of the mucin substrate. **Microbial Pathogenesis**, [S.L.], v. 45, n. 2, p. 115-123, ago. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18538533/>. Acesso em: 05 julho 2023.

GROSS, P. et al. Characterization of bromelain indicates a molar excess of inhibitor vs. enzyme molecules, a Jacalin-like lectin and Maillard reaction products. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [S.I.], v. 181, e113075, mar. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2019.113075>. Acesso em: 24 maio 2021.

GWOZDZINSKI L. et al. The Effect of Diosmin, Escin, and Bromelain on Human Endothelial Cells Derived from the Umbilical Vein and the Varicose Vein—A Preliminary Study. **Biomedicines**, v. 11, n. 6, p. 1702, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2227-9059/11/6/1702>. Acesso em: 05 jul 2023.

HEATON, L. E. et al. Selected In-Season Nutritional Strategies to Enhance Recovery for Team Sport Athletes: A Practical Overview. **Sports Med**, [S.I.], v. 47, p. 2201–2218, 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40279-017-0759-2#citeas>. Acesso em: 24 maio 2021.

HEITZMANN, H.; FUCHS, P. C; SCHIEFER, J. L. Historical Perspectives on the Development of Current Standards of Care for Enzymatic Debridement. **Medicina**, [S.I.], v. 56, n. 12, p. 706, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1648-9144/56/12/706/htm>. Acesso em: 24 maio 2021.

HIDAYAT, Y. et al. Antibacterial activity test of the partially purified bromelain from pineapple core extract (*Ananas comosus* [L.] Merr) by fractionation using ammonium sulfate acetone. **AIP Publishing**. 020067- 020067-6, 2018. Disponível em: <https://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.5064064>. Acesso em: 21 jun. 2021.

HIKISZ, P.; BERNASINSKA-SLOMCZEWSKA, J. Beneficial Properties of Bromelain. **Nutrients**, v. 13, n. 12, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34959865/>. Acesso em: 21 ago. 2023.

HORTENSE, F. T. P. Cuidados Específicos com a Traqueostomia Specific Care for Tracheostomy. **Estima**, [S.I.], v. 5, n. 1, 2007. Disponível em: <https://www.revistaestima.com.br/estima/article/view/208>. Acesso em: 26 maio 2021.

HU, P. A. et al. Bromelain confers protection against the non-alcoholic fatty liver disease in male C57BL/6 mice. **Nutrients**, v. 12, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32443556/>. Acesso em: 05 julho 2023.

HU, P. A. et al. New Mechanisms of Bromelain in Alleviating Non-Alcoholic Fatty Liver Disease-Induced Dereglulation of Blood Coagulation. **Nutrients**, v. 14, n. 11, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35684129/>. Acesso em: 05 julho 2023.

IZQUIERDO-VEGA, J. A. et al. Evidence of Some Natural Products with Antigenotoxic Effects. Part 1: Fruits and Polysaccharides. **Nutrients**, [S.l.], v. 9, n. 2, p. 102, 2017. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/9/2/102/htm>. Acesso em: 23 maio 2021.

JOHNSON-OBASEKI, S.; VELJKOVIC, A.; JAVIDNIA, H. Complication Rates of Open Surgical Versus Percutaneous Tracheostomy in Critically Ill Patients. **Laryngoscope**, [S.l.], v. 126, n. 11, p. 2459-2467, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27075530/>. Acesso em: 25 maio 2021.

LACEN, Laboratório Central de Saúde Pública. **Manual de coleta, acondicionamento e transporte de amostras biológicas para exames laboratoriais**, 2014.

LIEBERMAN, J. Measurement of sputum viscosity in a cone-plate viscometer. II. An evaluation of mucolytic agents in vitro. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 97, n. 4, p. 662-672, 1968. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4966952/>. Acesso em: 22 maio 2021.

LYNN, Pamela. **Habilidades de enfermagem clínica de Taylor: uma abordagem ao processo de enfermagem**. Tradução Regina Machado Garcez. 2. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

MAHMOOD, A. et al. Protease-functionalized mucus penetrating microparticles: In-vivo evidence for their potential. **International journal of pharmaceutics.**, [S.l.], v. 532, n. 1, 177–184, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517317308335?via%3Dihub>. Acesso em: 21 maio 2021.

MANZOOR, Z. et al. Bromelaína: Métodos de Extração, Purificação e Aplicações Terapêuticas. **Braz. arco. biol. technol**, Curitiba, v. 59, e16150010, 2016. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132016000100315&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 22 maio 2021.

MARQUES, M. A. A. et al. Caracterização das plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos para tratamento da osteoporose utilizados no brasil. **Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR**, Umuarama, [S.l.], v. 20, n. 3, p. 183-188, set./dez. 2016. Disponível em: <https://www.revistas.unipar.br/index.php/saude/article/view/5870/3382>. Acesso em: 18 maio 2021.

MARSCHÜTZ, M.K; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Thiolated polymers: self-crosslinking properties of thiolated 450 kda poly(acrylic acid) and their influence on mucoadhesion. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 15, n. 4, p. 387-394, maio 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11988400/>. Acesso em: 22 maio 2021.

MAURER, H.R. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [S.l.], v. 58, n. 9, p. 1234-1245, ago. 2001. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2FPL00000936>. Acesso em: 22 maio 2021.

MAVANI, H. A. K. et al. Antimicrobial Efficacy of Fruit Peels Eco-Enzyme against *Enterococcus faecalis*: An In Vitro Study. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, [S.I.], v. 17, n. 14, p. 5107, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1660-4601/17/14/5107/htm>. Acesso em: 23 maio 2021.

MENDES, M. L. et al. Efficacy of proteolytic enzyme bromelain on health outcomes after third molar surgery. Systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. **Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal**, [S.I.], v. 24, n. 1, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6344017/>. Acesso em: 24 maio 2021.

MOTA, M. et al. Novas técnicas cromatográficas. **Publindústria**, [S.I.], v. 1, n. 4, p. 34-39, 2006. Disponível em: <https://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/5804>. Acesso em: 24 maio 2021.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. Revista Processos Químicos. **Revista científica da Faculdade de Tecnologia SENAI Roberto Mange**, v. 3, n. 5, jan/jun 2009. Disponível em: http://ojs.rpqsenai.org.br/index.php/rpq_n1/article/view/83. Acesso em: 21 ago. 2023.

MURGIA, X. et al. The role of mucus on drug transport and its potential to affect therapeutic outcomes. **Adv Drug Deliv Rev.**, v.15, n.124, p.82-97, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29106910/>. Acesso em: 05 julho 2023.

MURAKAMI, M. et al. Impact of Oral Intake of Glucosylceramide Extracted from Pineapple on Xerostomia: A Double-Blind Randomized Cross-Over Trial. **Nutrients**, [S.I.], v. 11, n. 9, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/9/2020/htm>. Acesso em: 18 maio 2021.

NOR, M.Z.M. et al. Characteristic properties of crude pineapple waste extract for bromelain purification by membrane processing. **Food and Bioproducts Processing**, v. 52, p. 7103-7112, 2015. Disponível em: https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.springer-doi-10_1007-S13197-015-1812-5. Acesso em: 21 ago. 2023.

NOR, M. Z. M. et al. Separation of bromelain from crude pineapple waste mixture by a twostage ceramic ultrafiltration process. **Food and Bioproducts Processing**, [S.I.], v. 98, p. 1-38, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960308516000110>. Acesso em: 21 maio 2021.

NOVAES, L.C.L. et al. Stability, Purification, and Applications of Bromelain: A Review. **Biotechnol. Prog**, v. 32, p. 5-13, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26518672/>. Acesso em: 21 ago. 2023.

OLIVEIRA, A. C. D.; ROPKE, C. D. Os dez anos da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e os principais entraves da cadeia produtiva de extratos vegetais e medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, p. 95-219, 2016. Disponível em:

<https://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/333/pdf>. Acesso em 26 de maio 2021.

OLIVEIRA, L. C. C. et al. Antibacterial Activity of the Pyrogallol against *Staphylococcus aureus* Evaluated by Optical Image. **Biologics**, [S.L.], v. 2, n. 2, p. 139-150, 20 maio 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2673-8449/2/2/11>. Acesso em: 22 maio 2023.

PASSALI, D. et al. Bromelain's penetration into the blood and sinonasal mucosa in patients with chronic rhinosinusitis. **Acta Otorhinolaryngologica Italica**, [S.I.], v. 38, n. 3, jun. 2018. Disponível em: <https://www.actaitalica.it/article/view/62#sec-2>. Acesso em: 22 maio 2021.

PAULA FILHO, G. X. D. et al. Wild pineapple (*Ananas bracteatus* (Lindl.), var. *albus*) harvested in forest patches in rural area of Viçosa, Minas Gerais, Brazil: excellent source of minerals and good source of proteins and vitamin C. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, [S.I.], v. 38, n. 3, 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbf/a/LmpV9b3TNqrLCDj5MYnbYNM/?lang=en>. Acesso em: 18 maio 2021.

PEIXOTO, D. M. et al. Uso do mel de abelha associado ao Ananas comosus (Bromelin) no tratamento da tosse irritativa aguda. **Revista Paulista de Pediatria**, [S.I.], v. 34, n. 4, p. 412-417, dez. 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rpp/a/zCyzSjcPrRKf6Q5H8MrH5RH/?lang=pt>. Acesso em: 22 maio 2021.

PÉREZ, J. M. et al. Traqueostomía percutánea en pacientes ventilados. **Med Intensiva**, [S.I.], v. 31, n. 3, p. 120-125, 2007. Disponível em: <https://www.medintensiva.org/es-traqueostomia-percutanea-pacientes-ventilados-articulo-13101487>. Acesso em: 25 maio 2021.

PIAZZA, C. et al. Long-term intubation and high rate of tracheostomy in COVID-19 patients might determine an unprecedented increase of airway stenoses: a call to action from the European Laryngological Society. **Eur Arch Otorhinolaryngol.**, v. 278, n. 1, p. 1-7, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7275663/>. Acesso em: 25 maio 2021.

PILLAI, K.; AKHTER, J.; MORRIS, D. L. Assessment of a novel mucolytic solution for dissolving mucus in pseudomyxoma peritonei: an ex vivo and in vitro study. **Pleura and peritoneum.**, [S.I.], v. 2, n. 2, p. 111-117, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6405029/>. Acesso em: 21 maio 2021.

RAMLI, A. N. M. et al. Comparative structural analysis of fruit and stem bromelain from *Ananas comosus*. **Food Chemistry**, [S.I.], v. 266, p. 183-191, nov. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.125>. Acesso em: 19 maio 2021.

RAMOS, L. M. et al. Vegetative development of Turiaçu pineapple under two ecological conditions in Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [S.I.], v. 42, n. 6, 2020. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rbf/a/v6qYWMFLY8rrmtVSf9Bmt8p/?lang=en>. Acesso em: 24 maio 2021.

RATHNAVELU, V. et al. Potential role of bromelain in clinical and therapeutic applications. **Biomedical Reports**, [S.l.], v. 5, n. 3, p. 283-288, 18 jul. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4998156/pdf/br-05-03-0283.pdf>. Acesso em: 22 maio 2021.

REIS, J. G. A. C. et al. Ex-vivo mucolytic and anti-inflammatory activity of BromAc in tracheal aspirates from COVID-19. **Biomed Pharmacother**, v. 148, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35272139/>. Acesso em: 05 julho 2023.

RIBEIRO, L. H. L. Análise dos programas de plantas medicinais e fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS) sob a perspectiva territorial. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.24, n.5, p.1733-1742, 2019. Disponível em: <https://www.scielo.org/pdf/csc/2019.v24n5/1733-1742/pt>. Acesso em: 26 maio 2021.

RICZ, H. M. A. et al. Traqueostomia. **Medicina (Ribeirão Preto)**, [S.l.], v. 44, n. 1, p. 63-69, 2011. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/47337>. Acesso em: 25 maio 2021.

RODRIGUES FILHO, E. M.; JUNGES, J. R. Traqueostomia no doente crítico na era do consentimento livre e esclarecido. **Rev. bioét. (Impr.)**, [S.l.], v. 25, n. 3, p. 502-511, 2017. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bioet/a/7rtqgbLT68hgygvk4DJqk9p/?lang=pt#:~:text=A%20traqueostomia%20no%20doente%20cr%C3%ADtico,obtido%20para%20realizar%20o%20procedimento>. Acesso em: 24 maio 2021.

ROWAN, A. D.; BUTTLE, D. J. Pineapple cysteine endopeptidases. **Methods In Enzymology**, [S.l.], v.244, p. 555-568, 1994. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)44040-9](http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879(94)44040-9). Acesso em: 19 maio 2021.

SANTOS A.L et al. Complicações microvasculares em diabéticos Tipo 2 e fatores associados: inquérito telefônico de morbidade autorreferida. **Ciência e Saúde Coletiva**, [S.l.], v.20, n.3, 761-770, 2016. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=s141381232015000300761&script=sci_arttext&tlng=pt. Acesso em: 21 maio 2021.

SAEBO, T. O.; HANSEN, R. E. Adaptive phase estimation filter in long range synthetic aperture sonar interferometry. **Electronics Letters**, v. 59, n. 10, 2023. Disponível em: <https://ietresearch.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1049/ell2.12819>. Acesso em: 22 maio 2021.

SANTOS, P. C. J. L. et al. Interferência de medicamentos utilizados nos exames laboratoriais para monitoramento de dislipidemias e diabetes mellitus. **Unisanta Health Science**, v. 1, n. 1, p. 18-32, 2017. Disponível em: <https://periodicos.unisanta.br/index.php/hea/article/download/1002/976>. Acesso em: 21 ago. 2023.

SILVA, M. G. F. D.; SILVA, M. M. P. D. Avaliação do uso de fitoterápicos em distúrbios psiquiátricos. **Rev. Aten. Saúde**, São Caetano do Sul, v. 16, n. 56, p. 77-82, abr/jun., 2018. Disponível em: https://seer.uscs.edu.br/index.php/revista_ciencias_saude/article/view/4951. Acesso em: 18 maio 2021.

SILVEIRA, E. et al. Expanded bed adsorption of bromelain (E.C. 3.4.22.33) from *Ananas comosus* crude extract. **Brazilian Journal Of Chemical Engineering**, [S.l.], v. 26, n. 1, p. 149-157, mar. 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0104-66322009000100014>. Acesso em: 23 maio 2021.

SOARES, A. N. et al. Potenciais efeitos imunomoduladores de nutracêuticos no tratamento de covid-19. **International Journal of Development Research**, [S.l.], v. 11, n. 04, p. 46233-46238, abr. 2021. Disponível em: <https://www.journalijdr.com/potenciais-efeitos-imunomoduladores-de-nutrac%C3%AAuticos-no-tratamento-de-covid-19>. Acesso em: 22 maio 2021.

SOUSA, I. P. et al. Nanoparticles decorated with proteolytic enzymes, a promising strategy to overcome the mucus barrier. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, [S.l.], v. 97, p. 257–264, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641115000119?via%3Dihub>. Acesso em: 21 maio 2021.

SOUZA, A. D. Z. et al. O Processo de trabalho dos enfermeiros da atenção primária e a Política Nacional de Plantas Medicinais/Fitoterápicos. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.18, n.2, p.480-487, 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbpm/a/mBjCQnTv84Rm7WZKLzgtg3F/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 26 maio 2021.

SHARMA, M.; GUPTA, N.; PANDEY, E. Implications of nasal delivery of bromelain on its pharmacokinetics, tissue distribution and pharmacodynamic profile-A preclinical study. **PLoS One**, v. 17, n. 11, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36399461/>. Acesso em: 26 maio 2021.

TAUSSIG, S. J.; BATKIN, S. Bromelain, the enzyme complex of pineapple (*Ananas comosus*) and its clinical application. An update. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 22, n. 2, p. 191-203, fev. 1988. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741\(88\)90127-4](http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741(88)90127-4). Acesso em: 22 maio 2021.

TOMCHINSKY, B.; MING, L. C. As plantas comestíveis no Brasil dos séculos XVI e XVII segundo relatos de época. **Rodriguésia**, [S.l.], Rio de Janeiro, v. 70, 2019. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rod/a/MBqMBGbzvS7PmQLKGYpKZ3y/?lang=pt#:~:text=A%20partir%20deste%20trabalho%20foi,%2C%20batata%2Ddoce%20e%20milho>. Acesso em: 22 maio 2021.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ. Sistema de Bibliotecas. **Guia de normalização de trabalhos acadêmicos**. 4 ed. Fortaleza: UECE, 2022.

VALGAS, P.; QUEIROZ, F. Utilização de plantas medicinais e fitoterápicos como emagrecedores por mulheres de um projeto social em sete lagoas/mg. **Revista Brasileira de Ciências da Vida**, [S.l.], v. 5, n.1, 2017. Disponível em:<http://jornalold.faculdadecienciasdavid.com.br/index.php/RBCV/article/view/237>. Acesso em: 18 maio 2021.

VIEIRA, L. M. et al. Bromelina extraída do abacaxi - uma revisão. **Rev. Ref. Saúde-FESGO**, Goiás, v. 3, n. 2, p. 53-60. Disponível em: <http://periodicos.estacio.br/index.php/rrefsfego/article/view/9185>. Acesso em: 24 maio 2021.

VARILLA, C. et al. Bromelain, a Group of Pineapple Proteolytic Complex Enzymes (*Ananas comosus*) and Their Possible Therapeutic and Clinical Effects. **A Summary. Foods (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 10, p. 2249, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34681298/>. Acesso em: 24 ago 2023.

WANKAT, P. C. **Separation process engineering**. 2 ed. Hoboken: Prentice Hall, 2006.

WEBER, M. et al. Blood-Contacting Biomaterials: In Vitro Evaluation of the Hemocompatibility. **Front Bioeng Biotechnol**, v. 6, n. 99, 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2018.00099/full>. Acesso em: 05 julho 2023.

WILCOX, M. D. et al. The effect of nanoparticle permeation on the bulk rheological properties of mucus from the small intestine. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics.**, [S.l.], v. 96, p. 484–487, 2015. Disponível em:<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25758122/>. Acesso em: 21 maio 2021.

ZAPATA-CONTRERAS, L.; HOYOS-CUERVO, C. E.; FLORIÁN-PÉREZ, M. C. Open tracheostomy in patients with dual platelet aggregation inhibitors: case series. **Colombian Journal Of Anesthesiology**, [S.l.], v. 47, v. 3, p.189-193, 2019. Disponível em: https://journals.lww.com/rca/fulltext/2019/09000/open_tracheostomy_in_patients_with_dual_platelet.10.aspx. Acesso em: 25 maio 2021.

ZDROJEWICZ, Z. et al. Health-promoting properties of pineapple. **Pediatr Med Rodz**, [S.l.], v. 14, n. 2, p. 133-142, 2018. Disponível em: <http://pimr.pl/index.php/issues/2018-vol-14-no-2/health-promoting-properties-of-pineapple>. Acesso em: 21 jun. 2021.

ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE
 HUMANA E ANIMAL
 MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA
 EM SAÚDE HUMANA E ANIMAL



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Prezado participante,

Você está sendo convidado (a) a participar da pesquisa " **BIOPROSPECÇÃO DA AÇÃO PROTEOLÍTICA DA BROMELINA NA SECREÇÃO DE PACIENTES TRAQUEOSTOMIZADOS: um estudo in vitro**", desenvolvida por Eduardo Henrique Barros Ferreira, discente do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal sob orientação do Professor Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula. O TCLE será impresso em 02 vias e rubricado em todas as páginas e assinado ao seu término por você e pelos pesquisadores. Ao seu término e após seu consentimento, mediante sua assinatura, você receberá 1 cópia e outra ficará com o pesquisador delegado a esta função.

DA JUSTIFICATIVA / OBJETIVOS / PROCEDIMENTOS: A realização do estudo terá sua contribuição na recomendação baseada em uma experimentação científica da enzima bromelina analisada como uma alternativa terapêutica aos medicamentos sintéticos, utilizados para fluidificar as secreções produzidas por pacientes traqueostomizados, onde em estudos futuros serão testados in vivo, para oferecer uma alternativa eficaz e com menos efeitos colaterais que os fármacos já utilizados. A pesquisa traz como objetivo avaliar em estudo in vitro a ação da bromelina de diferentes partes do ananas comosus no escarro de pacientes traqueostomizados. Trata-se de um estudo experimental in vitro, com delineamento programado para realização no Programa de Pós Graduação em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal e em laboratório a ser definido pelo pesquisador. Os espécimes serão obtidos na cidade de Teresina, Capital do Piauí, essas amostras serão extraídas diretamente de abacaxis Pérola, pois dentre as variedades existentes de abacaxi essa é amplamente cultivada no Brasil. O material biológico será obtido após a aspiração de



PPGBiotec - Programa Profissional de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde
 Humana e Animal
 Coordenação Geral do Programa de Pós-Graduação - PPGBiotec
 Universidade Estadual do Ceará - UECE
 Av. Dr. Silas Mangaba, 1700, Campus do Itaperi, Fortaleza-CE - CEP: 60.714-903
 E-mail: ppgbiotec.ucece@uece.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE
HUMANA E ANIMAL
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA
EM SAÚDE HUMANA E ANIMAL



1/4

Rubrica _____

pacientes traqueostomizados, sendo coletado antes na utilização de medicações que tenham ação mucolítica, onde o procedimento é padrão dentro das unidades de terapia intensiva, após uma avaliação das características respiratórias, devendo ocorrer quando os clientes não conseguem eliminar as secreções. Para que se torne viável a realização desta pesquisa haverá uma parceria entre a instituição do pesquisador (Universidade Estadual do Ceará- UECE) e o hospital Casamater em Teresina-PI, que fornecerá uma lista com os nomes dos pacientes traqueostomizados, internados na unidade de terapia intensiva, onde serão escolhidos através de sorteio para evitar viés. Depois do processo de seleção, os pacientes serão procurados e receberão um convite verbal para participar da pesquisa. A seguir, um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) será disponibilizado e assinado por um familiar responsável, caso aceite ceder material biológico para a pesquisa.

RISCOS: De modo geral, a pesquisa oferece baixo risco aos participantes, pois os mesmos já realizavam o procedimento de aspiração traqueal, porém, o procedimento em si, pode gerar desconforto, traumas na mucosa, e até mesmo infecções.

BENEFÍCIOS: Quanto aos benefícios, é visto que esses ultrapassam os riscos, pois a realização da pesquisa proporcionará a aquisição de conhecimento científico sobre o tema, possibilitando, desta forma, a inserção de novos tratamentos que visem atender as necessidades dos pacientes hospitalizados, diminuindo a necessidade de procedimentos invasivos. Outro benefício do estudo é o aprofundamento dos conhecimentos teóricos sobre a bromelina e seu potencial nutracêutico, sua ação enzimática e proteolítica, além de poder embasar futuras pesquisas para a utilização da substância dentro do ambiente hospitalar, minimizando gastos e oferecendo tratamentos mais seguros e confortáveis para os clientes.



PPGBiotec - Programa Profissional de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde
Humana e Animal
Coordenação Geral do Programa de Pós-Graduação - PPG Biotec
Universidade Estadual do Ceará - UECE
Av. Dr. Sílvio Manguba, 1700, Campus do Itaperi, Fortaleza-CE - CEP: 60.714-903
E-mail: ppgbiotec.ucece@uece.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE
HUMANA E ANIMAL
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA
EM SAÚDE HUMANA E ANIMAL



2/4

Rubrica _____

FORMA DE ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA: Todos os riscos da pesquisa serão acompanhados e será de inteira responsabilidade dos pesquisadores, que dispõem de estratégias para minimizar esses riscos, sendo o procedimento de aspiração será feito de forma estéril, por um profissional capacitado, utilizando todos os equipamentos de proteção individual.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO:

Você será esclarecido (a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios. Os pesquisadores irão tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados da pesquisa serão enviados para a instituição e permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO: A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional.

DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE:

Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar.



PPGBiotec - Programa Profissional de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde
 Humana e Animal
 Coordenação Geral do Programa de Pós-Graduação - PPGBiotec
 Universidade Estadual do Ceará - UECE
 Av. Dr. Silas Mangaba, 1700, Campus do Itaperi, Fortaleza-CE - CEP: 60.714-903
 E-mail: ppgbiotec.ucc@uece.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE
HUMANA E ANIMAL
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA
EM SAÚDE HUMANA E ANIMAL



3/4

Rubrica _____

O (a) pesquisador (a) _____ certificou-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais. Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dúvidas poderei contatar os pesquisadores.

 Participante pesquisa

Teresina-PI, ____ / ____ / ____

 Professor Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula

CPF:

 Eduardo Henrique Barros Ferreira

CPF:

Contato Pesquisador responsável:

E-mail:

Contato Pesquisador participante:

E-mail:

4/4

Rubrica _____



PPGBiotec - Programa Profissional de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde
 Humana e Animal
 Coordenação Geral do Programa de Pós-Graduação - PPGBiotec
 Universidade Estadual do Ceará - UECE
 Av. Dr. Silas Mangaba, 1700, Campus do Itaperi, Fortaleza-CE - CEP: 60.714-903
 E-mail: ppgbiotec.uccc@uece.br

ANEXO B- CARTA DE APRECIÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



FACULDADE DE CIÊNCIAS E
TECNOLOGIA DO MARANHÃO
FACEMA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: BIOPROSPECÇÃO DA AÇÃO PROTEOLÍTICA DA BROMELINA NA SECREÇÃO DE PACIENTES TRAQUEOSTOMIZADOS: um estudo in vitro

Pesquisador: EDUARDO HENRIQUE BARROS FERREIRA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 66827723.9.0000.8007

Instituição Proponente: FACULDADE DE CIENCIAS E TECNOLOGIA DO MARANHAO LTDA - ME

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.901.121

Apresentação do Projeto:

BIOPROSPECÇÃO DA AÇÃO PROTEOLÍTICA DA BROMELINA NA SECREÇÃO DE PACIENTES TRAQUEOSTOMIZADOS: um estudo in vitro 66827723.9.0000.8007 EDUARDO HENRIQUE BARROS FERREIRA Trata-se de um estudo de abordagem quantitativa ou qualitativa dos dados. A pesquisa pretende Avaliar em estudo in vitro a ação da bromelina de diferentes partes do ananas comosus no escarro de pacientes traqueostomizados. O cenário da realização desse estudo será o hospital Casamater em Teresina-PI. A população fonte para a realização desta pesquisa será constituída por pacientes traqueostomizados com idade superior a 18 anos, de ambos os sexos. Critério de inclusão: Os critérios de inclusão da pesquisa serão selecionados pacientes traqueostomizados com idade superior a 18 anos, de ambos os sexos, que estejam internados na unidade de terapia intensiva do hospital Casamater em Teresina-PI, recebendo assistência hospitalar, onde o familiar responsável deverá assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Critério de exclusão: Serão excluídos do estudo pacientes que não estarão aptos para o estudo pessoas com idade inferior a 18 anos, ou que não estejam em tratamento de infecções respiratórias.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar em estudo in vitro a ação da bromelina de diferentes partes do ananas comosus no escarro de pacientes traqueostomizados.

Endereço: FACEMA - Rua Aarão Reis, nº 1000

Bairro: Centro

CEP: 65.606-020

UF: MA

Município: CAXIAS

Telefone: (99)3422-6800

E-mail: cepunifacema@unifacema.edu.br



FACULDADE DE CIÊNCIAS E
TECNOLOGIA DO MARANHÃO
FACEMA



Continuação do Parecer: 5.901.121

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos apresentados no projeto são para pesquisa ou para os sujeitos participantes da pesquisa. Os riscos apontados estão relacionados à metodologia da coleta dos dados, comprometendo assim os resultados da pesquisa e os benefícios para os participantes. Os riscos para os participantes da pesquisa aparecem somente no projeto de pesquisa ou no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e ainda de maneira completa ou genérica: De modo geral, a pesquisa oferece baixo risco aos participantes, pois os mesmos já realizavam o procedimento de aspiração traqueal, porém, o procedimento em si, pode gerar desconforto, traumas na mucosa, e até mesmo infecções. Para minimizar os riscos, o procedimento de aspiração será feito de forma estéril, por um profissional capacitado, utilizando todos os equipamentos de proteção individual.

Os benefícios apresentados são para os participantes da pesquisa ou para os pesquisadores: Quanto aos benefícios, é visto que esses ultrapassam os riscos, pois a realização da pesquisa proporcionará a aquisição de conhecimento científico sobre o tema, possibilitando, desta forma, a inserção de novos tratamentos que visem atender as necessidades dos pacientes hospitalizados, diminuindo a necessidade de procedimentos invasivos. Outro benefício do estudo é o aprofundamento dos conhecimentos teóricos sobre a bromelina e seu potencial nutracêutico, sua ação enzimática e proteolítica, além de poder embasar futuras pesquisas para a utilização da substância dentro do ambiente hospitalar, minimizando gastos e oferecendo tratamentos mais seguros e confortáveis para os clientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os termos foram todos apresentados e o pesquisador responsável tem experiências adequadas à realização do projeto, como atestado pelo currículo Lattes apresentado. A metodologia apresentada é consistente e descreve os procedimentos para realização da coleta e análise dos dados. O protocolo de pesquisa não apresenta conflitos éticos estabelecidos na Resolução 466-12 do CNS.

Endereço: FACEMA - Rua Aarão Reis, nº 1000

Bairro: Centro

CEP: 65.606-020

UF: MA

Município: CAXIAS

Telefone: (99)3422-6800

E-mail: cepunifacema@unifacema.edu.br



FACULDADE DE CIÊNCIAS E
TECNOLOGIA DO MARANHÃO
FACEMA



Continuação do Parecer: 5.901.121

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos foram todos apresentados e o pesquisador responsável tem experiências adequadas à realização do projeto, como atestado pelo currículo Lattes apresentado. A metodologia apresentada é consistente e descreve os procedimentos para realização da coleta e análise dos dados. O protocolo de pesquisa não apresenta conflitos éticos estabelecidos na Resolução 466-12 do CNS.

Recomendações:

O (A) parecerista solicita as seguintes recomendações no projeto de pesquisa:

Ajustar o TCLE, colocando no mesmo como o pesquisador irá minimizar os riscos.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto aprovado, estando de acordo com a resolução 466/12.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|---|------------------------|--|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2073888.pdf | 11/01/2023 16:06:31 | | Aceito |
| Folha de Rosto | folhaDR.pdf | 11/01/2023 15:34:57 | EDUARDO HENRIQUE BARROS FERREIRA | Aceito |
| Orçamento | Orcamento.docx | 11/01/2023 15:33:09 | EDUARDO HENRIQUE BARROS FERREIRA | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto.docx | 11/01/2023 15:31:38 | EDUARDO HENRIQUE BARROS FERREIRA | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE.docx | 11/01/2023 15:28:16 | EDUARDO HENRIQUE BARROS FERREIRA | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | cartaANUE.pdf | 11/01/2023 15:27:32 | EDUARDO HENRIQUE BARROS FERREIRA | Aceito |
| Cronograma | CRONOGRAMA.docx | 10/01/2023 15:33:01 | EDUARDO HENRIQUE BARROS FERREIRA | Aceito |

Endereço: FACEMA - Rua Aarão Reis, nº 1000

Bairro: Centro

CEP: 65.606-020

UF: MA

Município: CAXIAS

Telefone: (99)3422-6800

E-mail: cepunifacema@unifacema.edu.br



FACULDADE DE CIÊNCIAS E
TECNOLOGIA DO MARANHÃO
FACEMA



Continuação do Parecer: 5.901.121

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAXIAS, 16 de Fevereiro de 2023

Assinado por:

**Magnólia de Jesus Sousa Magalhães
(Coordenador(a))**

Endereço: FACEMA - Rua Aarão Reis, nº 1000

Bairro: Centro

CEP: 65.606-020

UF: MA

Município: CAXIAS

Telefone: (99)3422-6800

E-mail: cepunifacema@unifacema.edu.br

ANEXO C- COMPROVANTE DE AQUISIÇÃO DE BROMELINA

SM EMPREENDIMENTOS FARMACÉUTICOS LTDA

CERTIFICADO DE ANÁLISE

| | | | |
|-----------------------------|------------------------|-------------------------|----------------|
| Insumo: | Bromelaina (Bromelina) | Data de Análise: | 17-01-2022 |
| Lote Interno: | 22A07-B060-087020 | Lote Fabricante: | BR2021111801 |
| Data de Fabricação: | 18-11-2021 | Data de Validade: | 17-11-2023 |
| Origem: | Estados Unidos | Procedência: | Estados Unidos |
| Condições de Armazenamento: | Temperatura Geladeira | Ordem de Fracionamento: | 087020 |

| | | | |
|--------------------|---------------------------------|-----------------|------------|
| DCB: | 01368 | DCI: | BROMELAINS |
| CAS: | 9001400-7 | Peso Molecular: | - |
| Fórmula Molecular: | - | | |
| Observações 1: | C. Enzimática - 1BTU = 1.09GDU | | |
| Observações 2: | Nome Científico: Ananas comosus | | |

| Testes | Especificações | Resultados | Unidade | Referências |
|---------------------------------|--|------------|---------|-------------|
| Descrição * | Pó quase branco a bege claro, com odor característico. | Conforme | | Fabricante |
| Sabot | Característico. | Conforme | | Fabricante |
| Umidade * | <= 7,0 (1g/ tempo automático/ 102°C) | 5,3 | % | Fabricante |
| Arsênio | <= 1 | Conforme | ppm | Fabricante |
| Chumbo | <= 3 | Conforme | ppm | Fabricante |
| Cádmio | <= 1 | Conforme | ppm | Fabricante |
| Mercúrio | <= 0,1 | Conforme | ppm | Fabricante |
| Bromelaina | >= 333 | 370 | GDU/g | Fabricante |
| Atividade identificável | Positivo para Bromelaina | Conforme | | Fabricante |
| Testes microbiológicos | | | | |
| Contagem total de bactérias * | <= 5000 | < 1000 | UFC/g | Fabricante |
| Fungos e leveduras * | <= 100 | < 10 | UFC/g | Fabricante |
| Coliformes * | <= 30 | < 10 | UFC/g | Fabricante |
| Salmonella * | Ausente | Ausente | | Fabricante |
| Escherichia coli * | Ausente | Ausente | | Fabricante |
| Staphylococcus aureus * | Ausente | Ausente | | Fabricante |
| Pseudomonas aeruginosa * | Ausente | Ausente | | Fabricante |
| Testes adicionais | | | | |
| Densidade aparente * | Informativo (Sem compactação) | 0,47 | g/mL | MG FB - VI |
| Cinzas insolúveis em ácidos * | <= 1,5 | 0,02 | % | MG FB - VI |
| Matéria estranha microscópica * | Ácaros mortos <= 5,0 | < 5,0 | | MG FB - VI |

* Resultados obtidos em análises realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade SM EMPREENDIMENTOS FARMACÉUTICOS LTDA. E os demais foram transcritos conforme certificado de análise do fabricante.

SM EMPREENDIMENTOS FARMACEUTICOS LTDA



Conclusão:

Aprovado (X)
Reprovado ()


Farmacêutico Responsável
João Paulo Sartin Mendes
CRF-GO: nº 7.355
Pague Serviços Brasil

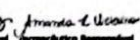

Farmacêutico Responsável
Victória Almeida
CRF-SP: nº 184.102
Pagara Brasil
SAT: (11) 4785-5608


Farmacêutico Responsável
Neely Oliveira de B. Soares
CRF-SP: nº 55.253
Inativy Pharma
SATEC: (19) 2101-0005


Farmacêutico Responsável
Bruno Soares Gomes de Saes
CRF-SP: nº 73.681
Via Pharma
SAC: (11) 4785-5643


Farmacêutico Responsável
Karine Herli de Silva
CRF-SP: nº 66.427
Pharmas Racional
SAC: (11) 3428-1199


Farmacêutico Responsável
Juliana Ferraz
CRF-SP: nº 64.366
Excelsior
SAT: (11) 2165-9259


Farmacêutico Responsável
Amanda R. Vitorino
CRF-SP: nº 50.836
Pharma Distribution Brasil
Orgânico Compounding
SAT: (11) 5160-4848

Fim do Documento

ANEXO D – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO NA REVISTA CONEXÕES- CIÊNCIAS E TECNOLOGIA (QUALIS A2)



USUÁRIO
Logado como:
3duardo2023
• Perfil
• Sair do sistema

TAMANHO DE FONTE
A⁺ A A⁻

CAPA SOBRE PÁGINA DO USUÁRIO PESQUISA ATUAL ANTERIORES NOTÍCIAS

Capa > Usuário > Autor > Submissões Ativas

Submissões Ativas

| ATIVO | ARQUIVO | | | | |
|-------|---------------|--------|--|---|-----------------------|
| ID | MM-DD ENVIADO | SECÇÃO | AUTORES | TÍTULO | SITUAÇÃO |
| 3530 | 09-15 | ANX | Ferreira, Arcanjo, Almeida, Vieira,... | AVALIAÇÃO DA AÇÃO PROTEOLÍTICA E HEMOCITOTÓXICA DA... | Aguardando designação |

Iniciar nova submissão
[CLIQUE AQUI](#) para iniciar os cinco passos do processo de submissão.

ISSN: 2176-0144

ANEXO E – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO NA REVISTA INTERFACES - SAÚDE, HUMANAS E TECNOLOGIA (QUALIS A3)

Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia

##navigation.backTo##

1557 / Ferreira et al. / AVALIAÇÃO DA BROMELINA QUANTO A VISCOSIDADE DA SECREÇÃO DE PACIENTES TRAQUEO Biblioteca da Submissão

Fluxo de Trabalho **Publicação**

Submissão **Avaliação** Edição de Texto Editoração

Arquivos da Submissão

Q. Buscar

| | | | |
|------|--|------------------|-----------------|
| 4860 | PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_5901121 (1).pdf | 15 setembro 2023 | Outros |
| 4861 | ARTIGO VISCOSIDADE.docx | 15 setembro 2023 | Texto do Artigo |

Baixar Todos os Arquivos