

Atividade da enzima bromelina em plantas de abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill), sob condições de salinidade "in vitro"

Piza, I. M. T.¹; Lima, G. P. P.¹; Brasil, O. G.¹; Piza, P. L. B. T.²

¹Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências, UNESP, CP 545, 13618-000. Botucatu, SP. E-mail: isabelapiza@laser.com.br, ²Departamento de Engenharia Rural, Energia na Agricultura, FCA, UNESP, Botucatu, SP, Brasil, E-mail: pedropiza@laser.com.br

RESUMO: Os objetivos deste trabalho foram caracterizar plantas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill) cv. Smooth Cayenne, cultivadas "in vitro" em meio salino, quanto à atividade da bromelina, identificar partes das plantas que apresentam maiores atividades da enzima e verificar a influência do estresse salino na sua atividade. Gemas axilares de abacaxi foram cultivadas "in vitro" em meio MS, acrescido de 2 mg.L⁻¹ de BAP e 1 mg.L⁻¹ de NAA. Os níveis de salinidade testados foram: 0,57 g.L⁻¹ de NaCl; 1,15 g.L⁻¹ de NaCl e 2,30 g.L⁻¹ de NaCl. A atividade da enzima bromelina foi quantificada em todas as fases de desenvolvimento das plantas "in vitro", em gemas, plantas e raízes. A atividade da bromelina foi maior em gemas nos maiores teores de sal aos 15 dias. No cultivo de plantas a atividade da enzima foi decrescente para os tratamentos salinos em todas as coletas até os 60 dias. As raízes formadas apresentaram atividade de bromelina maior em meio salino.

Palavras-chave: Abacaxi, bromelinas, ativadores de enzima, solos salitrosos.

ABSTRACT: Bromelian enzyme activity on pineapple plants (*Ananas comosus* L. Merrill) under saline conditions "in vitro". The objectives of this work were to characterize pineapple plants (*Ananas comosus* L. Merrill) cv. Smooth Cayenne, cultured "in vitro", in saline medium, in relation to bromelian activity, identifying the parts of the plant with the highest bromelian activity. Also under aim was the study of the influence of saline stress on the enzyme activity. Axillary buds of pineapple were cultivated "in vitro" in MS medium, supplemented with 2 mg.L⁻¹ BAP and 1 mg.L⁻¹ NAA. The levels of salinity tested were: 0.57 g.L⁻¹ NaCl, 1.15 g.L⁻¹ NaCl, and 2.30 g.L⁻¹ NaCl. Bromelian activity was evaluated in the development of buds, shoots, and roots. The results showed that bromelian activity was higher in buds at the highest salt concentration at 15 days. Cultured shoots showed bromelian activity decreasing in the saline treatments in all the collection, up to 60 days in culture. The roots showed higher bromelian activity in the roots in saline medium.

Key words: Pineapple, bromelians, enzyme activators, saltpetre soils.

INTRODUÇÃO

A bromelina (EC 3.4.22.4) é uma enzima proteolítica encontrada no abacaxi e em outras espécies de plantas da família Bromeliaceae, que está presente na fruta e na planta, principalmente no caule de onde é obtida comercialmente. Entretanto, a quantidade produzida ainda é pequena em relação às necessidades de mercado, o que a torna, um produto de alto valor comercial, que não é produzido no Brasil. A atividade proteolítica é o principal parâmetro de avaliação da qualidade e do valor comercial da bromelina.

Sua importância econômica está relacionada com a produção de fármacos, pois faz parte de componentes ativos de remédios que auxiliam a digestão. Na farmacologia, segundo Meinig (1999), o primeiro efeito da bromelina relatado foi como digestivo, substituindo a pepsina e tripsina em tratamentos de insuficiência pancreática. É utilizada também no tratamento de cardiopatias, artrite reumatóide, traumas cirúrgicos, edemas, sinusites, devido

principalmente a facilitar a coagulação sanguínea diminuindo os edemas e apresentar um efeito antiinflamatório. Faz parte de componentes ativos de fármacos que ativam a circulação sanguínea e respiração, pois suprimem os depósitos protéicos em veias e artérias. Nas terapias contra o câncer, é utilizada no aumento de lises de células cancerosas. Recentemente, tem sido relatado que as proteases extracelulares tem um papel específico regulatório na modulação da resposta imune e também podem agir como sinalizadoras em processos de metagênese (Mynott *et al.*, 1999). A bromelina promove o aumento nos níveis de antibióticos quando administrada concomitantemente a eles (Winter, 1990).

É empregada também nas indústrias de alimentos, no amaciamento da carne degradando suas proteínas conjuntivas, na produção de biscoitos a partir de farinhas de trigo com alto teor protéico, na produção de ovos desidratados, na preparação de leite de soja e isolados protéicos. Nas cervejarias para clarificação da cerveja, hidrolizando certos complexos proteínas-taninos,

Recebido para publicação em 29/11/01 e aceito para publicação em 29/07/02.

formados durante a fermentação (Freiman & Srur, 1999). É usada no tratamento de couros, nas indústrias têxteis para amaciamento de fibras e também na produção de detergentes (Santos, 1995).

A micropropagação de plantas, através da qual clones selecionados pelas suas características fenotípicas e livres de patógenos são propagados em condições assépticas e rigorosamente controlados, é uma técnica que pode ser utilizada como alternativa para o aumento da produção da enzima disponível para extração e consumo. Existem vantagens potenciais em se usar a cultura de tecidos vegetais como fonte de compostos industrialmente importantes como as enzimas, ao invés de produzi-los pelos meios tradicionais, entre elas: a independência dos fatores ambientais, incluindo clima, pragas, doenças e limitações geográficas e o relativo grau de controle durante a cultura permitindo que os níveis de produção possam ser ajustados de acordo com as demandas do mercado (Pletsch, 1999).

A salinidade no solo ou em cultivos "in vitro", por ser uma condição estressante, provoca respostas metabólicas nas plantas, tais como, as alterações nos níveis de proteínas e na atividade de enzimas. Em geral, plantas submetidas a estresse salino podem acumular solutos no citoplasma (Ulisses *et al.*, 1998).

Segundo Guillemín *et al.* (1995), os solos com alto teor de cloreto de sódio seriam pouco propícios para o cultivo de abacaxi por causarem redução de tamanho da planta e diminuição no tamanho e qualidade das frutas, principalmente por provocar distúrbios nutricionais, sendo que a cv. Smooth Cayenne se mostra mais sensível à salinidade quando comparada a outras cultivares. O abacaxizeiro é tido como uma cultura moderadamente tolerante a salinidade na faixa entre 640 ppm a 3840 ppm (3 a 6 dS/m), porém não há referência quanto à tolerância a sódio, cloro ou boro (Ayers & Westcot, 1991).

Assumindo-se a hipótese de que plantas de abacaxi produzidas "in vitro" possuem bromelinas bioquimicamente ativas, os objetivos deste trabalho foram: caracterizar plantas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill) cv. Smooth Cayenne, cultivadas "in vitro", quanto à atividade da bromelina, identificar partes das plantas que apresentam maiores atividades da enzima e verificar a influência do estresse salino na sua atividade.

MATERIAL E MÉTODO

Micropropagação

Para a obtenção de plantas, gemas axilares da coroa foram inoculadas em tubos de

ensaio contendo 15 ml de meio básico MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 2 mg.L⁻¹ de BAP, 1 mg.L⁻¹ de NAA, 1 mg.L⁻¹ de Tiamina como fonte de vitaminas, suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose e 100 mg.L⁻¹ de inositol, solidificado com 6 g.L⁻¹ de ágar, como proposto por Piza (1997). Para obtenção de estresse salino foi adicionado ao meio NaCl em concentrações intermediárias para a tolerância em solos salinos, sendo, a testemunha (omisso em sal), 0,57 g.L⁻¹ de NaCl, 1,15 g.L⁻¹ de NaCl e 2,30 g.L⁻¹ de NaCl.

Gemas axilares, plantas e raízes micropropagadas de abacaxi cultivar Smooth Cayenne foram utilizadas como material vegetal para a análise de bromelina. A atividade da enzima foi quantificada em todas as fases de desenvolvimento da planta "in vitro", ou seja, gemas em desenvolvimento (aos 0, 15 e 30 dias), plantas (aos 0, 15, 30, 60 e 90 dias) e raízes (aos 30 e 60 dias) em quatro tratamentos com quatro repetições.

Atividade de Bromelina

Para a obtenção do extrato bruto, o material vegetal foi pesado e macerado em 5 ml de tampão fosfato 0,2 M, pH 6,7 e filtrado 2 vezes em gaze.

A atividade da enzima foi obtida pelo método da digestão da caseína, segundo Kunitz (1947), com modificações, realizadas neste trabalho após testes preliminares para ajuste do método, onde 5 ml de caseína Hammarstein 1% foram incubados com 0,2 ml de extrato bruto a 35°C. Em tubos de ensaio adicionou-se:

Tubo 1: 5 ml de caseína + 0,2 ml extrato bruto;

Tubos 2 a 6: 5 ml de reativo de Bradford (1976).

Retirou-se uma alíquota de 0,1 ml do Tubo 1 e adicionou-se ao Tubo 2, agitou-se e realizou-se leitura de absorbância imediata em espectrofotômetro a 595 nm. Após 5 minutos, retirou-se nova alíquota de 0,1 ml do Tubo 1 e adicionou-se ao Tubo 3, agitou-se e realizou-se leitura imediata. Repetiu-se a operação a cada 5 minutos, utilizando os demais tubos, durante 20 minutos. Todo o procedimento foi realizado em banho-maria a 35°C.

A bromelina catalisa a hidrólise de substratos protéicos, bem como de substratos sintéticos. A atividade foi expressa em mg de caseína decomposta por minuto por grama de matéria fresca.

Foi utilizado o programa Estat-Graph (UNESP - Jaboticabal) para a análise estatística, sendo o delineamento experimental adotado o inteiramente casualizado ao nível de 5% pelo teste de Tukey. Foi determinada a curva de regressão nas análises realizadas, quando se comparou coletas (no tempo) e análise de variância, para as comparações entre os tratamentos.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Atividade da bromelina em gemas

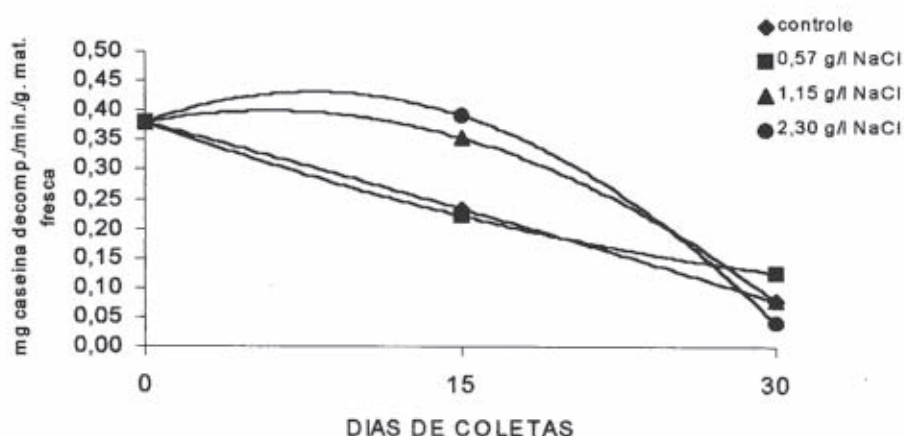
Observou-se diminuição na atividade de bromelina (Tabela 1) em todas as coletas do controle e nas concentrações de 0,57 e 1,15 g.L⁻¹

durante os 30 dias de observação. No nível mais alto de salinidade, ocorreu pequeno aumento de atividade aos 15 dias. Estes resultados estão representados graficamente na Figura 1.

TABELA 1 - Atividade de bromelina (mg de caseína decomposta por minuto por g. matéria fresca), em gemas micropropagadas de abacaxi em diferentes níveis de salinidade (omisso, 0,57 g.L⁻¹ NaCl, 1,15 g.L⁻¹ NaCl e 2,30 g.L⁻¹ NaCl), em três tempos de coletas.

Coletas (dias)	TRATAMENTOS*			
	Controle	0,57 g.L ⁻¹ NaCl	1,15 g.L ⁻¹ NaCl	2,30 g.L ⁻¹ NaCl
0	0,3798 ^A	0,3798 ^A	0,3798 ^A	0,3798 ^A
15	0,2348 ^B	0,2228 ^B	0,3545 ^A	0,3923 ^A
30	0,0780 ^B	0,1260 ^A	0,0785 ^B	0,0400 ^B

* Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%; para as linhas.



$$\begin{aligned} \text{controle } y &= 0,0005x^2 - 0,0093x + 0,38 \\ 0,57 \text{ g/l } y &= 0,0001x^2 - 0,0125x + 0,38 \\ 1,15 \text{ g/l } y &= -0,0006x^2 + 0,0067x + 0,38 \\ 2,30 \text{ g/l } y &= -0,0008x^2 + 0,0129x + 0,38 \end{aligned}$$

FIGURA 1 - Atividade de bromelina (mg de caseína decomposta por minuto por g. matéria fresca), em gemas micropropagadas de abacaxi em diferentes níveis de salinidade (omisso, 0,57 g.L⁻¹ NaCl, 1,15 g.L⁻¹ NaCl e 2,30 g.L⁻¹ NaCl), em três tempos de coletas.

Os resultados sugerem que houve influência da salinidade na atividade da enzima, pois embora na última coleta a atividade tenha sido baixa em todos os tratamentos, nos níveis maiores do sal ocorreu maior atividade da enzima aos 15 dias.

A atividade proteolítica da bromelina em extratos de folhas jovens regeneradas "in vitro" e em calos de plantas de abacaxi em diferentes estágios de desenvolvimento, foi quantificada por Apte *et al.* (1979) onde compararam os resultados com folhas adultas de plantas de abacaxi e também estudaram a purificação parcial da bromelina

destes tecidos. Folhas adultas apresentaram maior atividade proteolítica, quando comparadas com calos e com folhas jovens obtidas "in vitro" e a quantidade de proteína total também foi maior em folhas maduras. Nos calos, a atividade proteolítica variou significativamente durante as diversas fases de crescimento, com aumento de atividade aos 20, 35 e 45 dias, indicando que características de crescimento têm forte influência na atividade da enzima. Estas diferenças de atividade entre plantas regeneradas "in vitro", calos e plantas adultas indicaram que o processo de diferenciação pode não ter influência na formação de enzimas

proteolíticas, no entanto os estágios de desenvolvimento da planta durante o crescimento tem uma profunda influência na síntese de bromelina.

A atividade proteolítica da enzima depende de vários fatores como variedade, parte e idade da planta da qual é extraída. Freiman & Srur (1999) compararam a atividade proteolítica da bromelina comercial com a bromelina de resíduos de abacaxi (cascas, folhas, talos) e relataram que a bromelina obtida dos resíduos apresentou 40% de eficiência em relação à comercial, resultados estes considerados baixos pelos autores, que concluíram ser esta baixa atividade devido a tratos culturais, à cultivar ou à

interferência de compostos fenólicos.

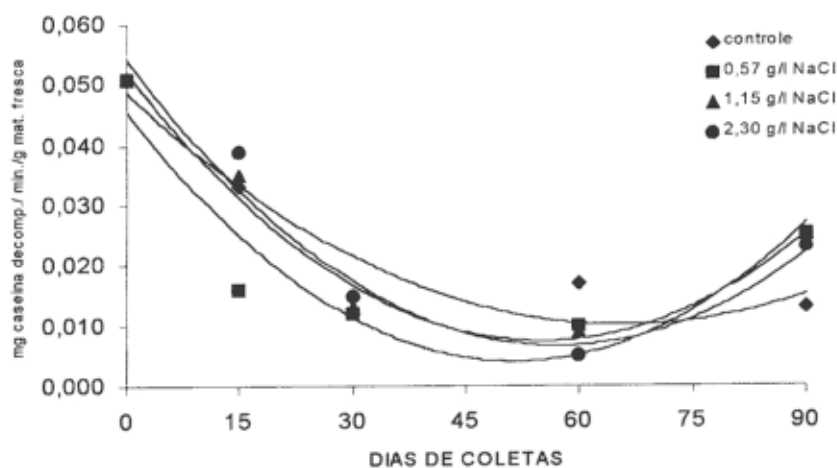
Em plantas micropropagadas, ocorreu aparentemente diminuição na atividade da enzima bromelina em todos os tratamentos entre as coletas 0 e 30 dias, embora só confirmada estatisticamente aos 15 dias em baixa salinidade (Tabela 2). Aos 60 dias, ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos, com diminuições constantes de atividade enzimática. Na última coleta, aos 90 dias, a menor atividade ocorreu no controle, diferindo significativamente dos demais. Estes resultados podem ser visualizados pela Figura 2.

Atividade de bromelina em plantas (parte aérea):

TABELA 2- Atividade de bromelina (mg de caseína decomposta por minuto por g. matéria fresca), em plantas (parte aérea) micropropagadas de abacaxi em diferentes níveis de salinidade (omisso, 0,57 g.L⁻¹ NaCl, 1,15 g.L⁻¹ NaCl e 2,30 g.L⁻¹ NaCl), durante 90 dias.

TRATAMENTOS*				
Coleta (dias)	Controle	0,57 g.L ⁻¹ NaCl	1,15 g.L ⁻¹ NaCl	2,30 g.L ⁻¹ NaCl
0	0,0510 ^A	0,0510 ^A	0,0510 ^A	0,0510 ^A
15	0,0325 ^A	0,0155 ^B	0,0350 ^A	0,0393 ^A
30	0,0150 ^A	0,0115 ^A	0,0125 ^A	0,0150 ^A
60	0,0170 ^A	0,0103 ^B	0,0087 ^{BC}	0,0048 ^C
90	0,0133 ^B	0,0250 ^A	0,0248 ^A	0,0233 ^{AB}

* Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%; para as linhas.



$$\text{Controle } y = 0,0034x^2 - 0,0229x + 0,0511, r^2 = 0,9676$$

$$0,57 \text{ g/l } y = 0,0073x^2 - 0,0349x + 0,049, r^2 = 0,9581$$

$$1,15 \text{ g/l } y = 0,0059x^2 - 0,0312x + 0,0539, r^2 = 0,9359$$

$$2,30 \text{ g/l } y = 0,0053x^2 - 0,0301x + 0,0552, r^2 = 0,8811$$

FIGURA 2- Atividade de bromelina (mg de caseína decomposta por minuto por g. matéria fresca), em plantas (parte aérea) micropropagadas de abacaxi em diferentes níveis de salinidade (omisso, 0,57 g.L⁻¹ NaCl, 1,15 g.L⁻¹ NaCl e 2,30 g.L⁻¹ NaCl), durante 90 dias.

Notou-se entre os tratamentos, curvas com a mesma tendência. Os níveis de salinidade testados aparentemente não tiveram influência na atividade da enzima, uma vez que não se observaram diferenças entre os tratamentos em relação ao controle, a não ser na última coleta onde os tratamentos com NaCl mostraram pequeno aumento de atividade.

O prolongado período de cultivo e também a salinidade podem ter provocado um estresse nas plantas, com aceleração na degradação de proteínas e conseqüentemente diminuição da atividade da enzima, por outro lado Mercier & Yoshida (1998) compararam a atividade proteolítica da bromelina em folhas de *Bromelia antiacantha* cultivadas "in vitro" recém formadas e com 6 meses de cultivo e concluíram que a atividade foi maior em plantas cultivadas aos 6 meses "in vitro", onde foi observado aumento de atividade de 22%. Os autores concluíram que a ocorrência de regeneração teve influência na atividade da enzima.

Segundo Melander & Horvath (1977) os sais exercem dois efeitos antagônicos sobre as proteínas: 1) Eles tendem a quebrar ligações eletrostáticas e 2) Aumentam as interações hidrofóbicas. Entretanto, os autores salientaram que estas não seriam as razões básicas para esperar uma diminuição ou estímulo de atividade de enzimas, dependendo basicamente de características estruturais específicas da proteína. Broetto (1995) afirmou que o estresse salino provocou diminuição na atividade da enzima sintetase de glutamina e no teor de proteínas solúveis em calos de feijão, atribuindo estes

resultados aos distúrbios provocados pelo sal no metabolismo levando a acúmulo de amônia o que provavelmente causou a inibição da atividade enzimática.

Comparando-se a atividade da enzima bromelina em gemas e plantas de abacaxi micropropagadas neste trabalho, observou-se, que gemas recém extraídas da coroa apresentaram maior atividade, diferindo dos resultados de Hernández et al. (1998), que afirmaram que extratos de folhas obtiveram os maiores valores de atividade quando comparado com gemas e agregados de gemas de abacaxi cultivados "in vitro". Uma hipótese para esta diferença em nosso trabalho pode ser o efeito da salinidade, que provavelmente interferiu no metabolismo de proteínas, levando a mudança na atividade da enzima nas gemas, principalmente no tratamento em alta salinidade aos 15 dias, onde se observou maior atividade.

Atividade de bromelina em raízes

Não ocorreu formação de raízes nos tratamentos com 1,15 g.L⁻¹ e 2,30 g.L⁻¹ de NaCl aos 30 dias na primeira coleta e 2,30 g.L⁻¹ aos 60 dias na segunda coleta, isto é, nos níveis mais altos de sal. Observa-se (Tabela 3) que aos trinta dias a atividade da bromelina mostrou diferença significativa de atividade entre o controle e o tratamento salino, com maior atividade em presença de NaCl. Na segunda coleta, aos 60 dias, os tratamentos salinos não mostraram diferença significativa entre eles, mas sim do controle que apresentou menor atividade da enzima.

TABELA 3- Atividade de bromelina (mg de caseína decomposta por minuto por g. matéria fresca), em raízes de plantas micropropagadas de abacaxi em diferentes níveis de salinidade (omisso, 0,57 g.L⁻¹ NaCl, 1,15 g.L⁻¹ NaCl e 2,30 g.L⁻¹ NaCl), aos 30 e 60 dias.

TRATAMENTOS*				
Coleta (dias)	Controle	0,57 g.L ⁻¹ NaCl	1,15 g.L ⁻¹ NaCl	2,30 g.L NaCl
30	0,0313 ^B	0,1743 ^A	-----	-----
60	0,0520 ^B	0,1108 ^A	0,1030 ^A	-----

* Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%; para as linhas.

Em relação ao tempo, notou-se aumento na atividade da enzima da primeira para a segunda coleta no controle (omisso) e diminuição em meio salino. Em raízes, além do efeito inibitório do sal na formação destas estruturas, pode ter ocorrido efeito estimulante da salinidade na atividade de bromelina, uma vez que os tratamentos com NaCl mostram maior atividade da enzima. Outras enzimas já mostraram alterações em plantas em resposta ao estresse. Após a elicitação fúngica de uma cultura de células de feijão, foi observada a indução da enzima PAL a qual foi atribuída a um aumento da síntese de novo de PAL-RNAm (Lawton et al.,

1983).

Em relação às diferentes estruturas (gemas, plantas e raízes) de abacaxi cultivadas "in vitro", observou-se que a atividade de bromelina foi maior em gemas e em raízes do que em plantas, evidenciando que a atividade da enzima variou em função do desenvolvimento da planta e em relação à estrutura na qual foi quantificada. Em relação às raízes, o tratamento com menor nível de NaCl induziu aumento na atividade da enzima, mas as concentrações mais altas de sal, prejudicaram o processo de enraizamento (Figura 3).

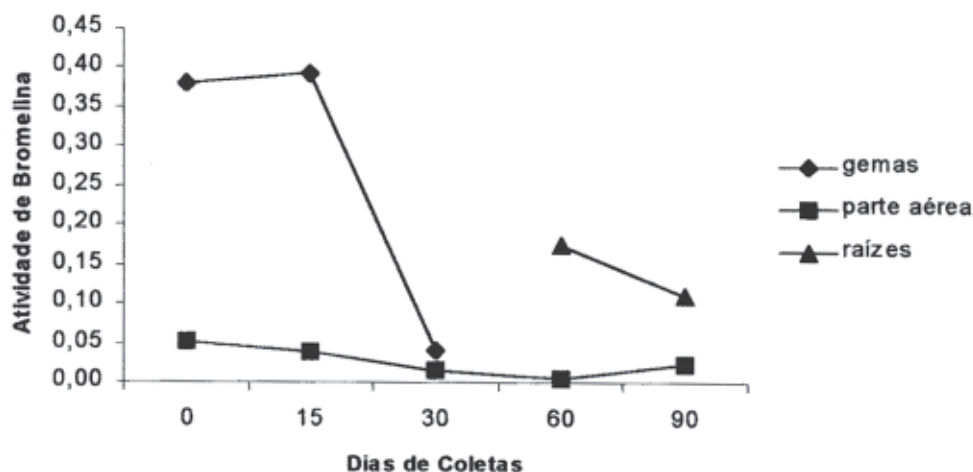


FIGURA 3- Atividade de bromelina em gemas e parte aérea micropropagadas em alta salinidade ($2,30 \text{ g.L}^{-1} \text{ NaCl}$) e em raízes obtidas em meio salino ($0,57 \text{ g.L}^{-1} \text{ NaCl}$).

CONCLUSÃO

Os resultados indicam maior atividade da enzima bromelina em gemas e raízes, do que nas partes aéreas das plantas, variando em função dos tratamentos salinos e fase do desenvolvimento vegetal.

As gemas mostraram ser o tecido com maior atividade em meios salinos aos 15 dias.

Nas partes aéreas das plantas, a atividade da enzima foi decrescente, em se aumentando as concentrações salinas, em todas as coletas até os 60 dias.

As raízes diferenciadas "in vitro" apresentam atividades crescentes da enzima bromelina, na mesma proporção em que se aumentam as concentrações de sais.

Os resultados sugerem que condições de estresse salino podem induzir a superexpressão genética, ou a maior eficiência de catálise, das enzimas envolvida na lise de metabólitos primários da planta, produzidos em maior escala nestas condições.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- APTE, P. V., KAKLIJ, G. S., HEBLE, M. R. Proteolytic enzymes (bromelain) in tissue culture of *Ananas sativus* (pineapple). *Plant Science Letters*, v.14, p.57-62, 1979.
- AYERS, R. S., WESTCOT, D. W. **A qualidade da água na agricultura**. Campina Grande: UFPB, 1991. 218 p.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p.248-54, 1976.
- BROETTO, F. **Efeito de estresse salino e biológico sobre o metabolismo de calos e suspensão de células de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Piracicaba, 1995. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luís de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- FREIMAN, L. O., SRUR, A. U. O. Determinação de proteína total e escore de aminoácidos de bromelina extraídas dos resíduos do abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 19, n2, p. 170-3, 1999.
- GUILLEMIN, J. P., GIANINAZZI, S., GIANINAZZI-PEARSON, V. et al. Influence des endomycorhizes à arbuscules sur la croissance et la nutrition minérale de vitroplants d'ananas dans un sol à forte salinité. *Fruits*, v. 50, p.333-41, 1995.
- HERNÁNDEZ, M., CARVAJAL, C., SANTOS, R. et al. Nuevas posibilidades para la obtención de bromelina a partir de cultivo de tecidos. In: ENCUESTRO LATINOAMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 3, 1998, La Habana. *Anais...* Cuba, 1998. v. 1, p. 486-87.
- KUNITZ, M. Crystalline trypsin inhibitor. II. General properties. *Journal of General Physiology*, v. 30, p. 295-310, 1947.
- LAWTON, M. A., DIXON, A. R., HAHNBROCK, K. et al. Elicitor induction of mRNA activity. Rapid effects of elicitor on phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthesis mRNA activities in bean cells. *European Journal of Biochemistry*, v. 130, p. 131-9, 1983.
- MEINIG, G. E. Bromelain. *Phytomedicine*, v. 2, p. 1-2, 1999.
- MELANDER, W., HORVATH, C. Salt effects on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: An interpretation of the lyotropic series. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 180, p. 200-15, 1977.
- MERCIER, H., YOSHIDA, M. K. Bromelain activity in the leaf tissue of *Bromelia antiacantha*. *Journal Bromeliad Society*, v. 48, n.1, p. 6-10, 1998.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, p. 473-497, 1962.
- MYNOTT, T. L., LADHAMS, A., SCARMATO, P. et al. Bromelain, from pineapple stems, proteolytically blocks activation of extracellular regulated kinase-2 in T cells. *Journal of Immunology*, v. 163, p. 2568-75, 1999.

- PIZA, I. M. T. **Poliâminas e Micropropagação do Abacaxizeiro (*Ananas comosus* L.) cv. Smooth Cayenne**. Botucatu, 1997. 107 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- PLETSCH, M. Compostos naturais biologicamente ativos. A aplicação da biotecnologia à produção de compostos naturais biologicamente ativos. **Biotecnologia Ciência Desenvolvimento**, v 10, p. 35-8, 1999.
- SANTOS, S. A. **Efeito do tempo na composição físico-química, química e na atividade da bromelina do caule do abacaxizeiro *Ananas comosus* (L.) Merr. Cv. Pérola, armazenado em condições com e sem refrigeração**. Lavras, 1995. 72 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras.
- ULISSES, C., ROCHA, P., ALBUQUERQUE, C. *et al.* Determinación de prolina en yemas de plátano (*Musa* sp. cv Nanicão-AAA) seleccionadas in vitro en cuanto a la tolerancia a la salinidad. In: **ENCUENTRO LATINOAMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL**, 3, 1998, La Habana. **Anais...** La Habana, 1998. v.1, p. 334-5.
- WINTER, H. L. On the pharmacology of bromelain: an updat with special regard to animal studies on dose-dependent effects. **Planta Medica**, v. 56, p.249-53, 1990.