The background of the entire page is a photograph of several papaya fruits and their flowers. Some fruits are whole and yellow, while others are cut open to show the red flesh and black seeds. The flowers are large and pinkish-red. The image is slightly blurred and has a soft, artistic feel.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

HELAINÉ CARNEIRO CAPUCHO

Desenvolvimento de formulações tópicas contendo papaína para o tratamento de feridas

Ribeirão Preto

2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

HELAINÉ CARNEIRO CAPUCHO

**Desenvolvimento de formulações tópicas contendo papaína
para o tratamento de feridas**

Ribeirão Preto
2007

HELAINÉ CARNEIRO CAPUCHO

**Desenvolvimento de formulações tópicas contendo papaína
para o tratamento de feridas**

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da Faculdade
de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo,
para a obtenção do título de mestre.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Vieira Fonseca

Ribeirão Preto

2007

Capucho, Helaine Carneiro.

Desenvolvimento de formulações contendo papaína para o tratamento de feridas / Helaine Carneiro Capucho; orientadora: Profa Dra Maria José Vieira Fonseca. – Ribeirão Preto – SP, 2007.

102 f.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Desbridamento – Queimaduras e feridas. 2. Papaína – Atividade proteolítica. 3. Formulações tópicas – Desenvolvimento.

Helaine Carneiro Capucho

**Desenvolvimento de formulações tópicas contendo
papaína para o tratamento de feridas**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de mestre.
Área de concentração: Fármacos e
Medicamentos

Trabalho apresentado e aprovado pela Banca Examinadora em ____/____/2007.

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra. Maria José Vieira Fonseca - Orientadora

Instituição: FCFRP – USP Assinatura: _____

*A Jorge Antônio Capucho, meu amado pai,
com toda admiração, pelo exemplo de luta,
fé, perseverança e caráter,*

*A Felipe Dias Carvalho,
com amor, pela dedicação, companheirismo,
e pela presença essencial na superação de obstáculos,*

Dedico.

*"É melhor tentar e falhar,
que se preocupar a ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que se sentar fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ... "*
Martin Luther King

Agradecimentos

*“O pequeno e bravo ato de cooperar com outra pessoa,
de escolher a verdade ao cinismo, a generosidade ao egoísmo,
faz o cérebro se iluminar com uma alegria serena.”*

Dr. Gregory S. Berns

Muitas pessoas estarão nestas páginas. Com toda certeza, têm os seus cérebros e corações iluminados com alegria, pois todas contribuíram para este trabalho, cada uma à sua maneira. Não sei se saberei expressar toda a minha gratidão, e talvez tenha esquecido de citar alguém, mas tenham certeza de que cada um de vocês tem um lugar no meu coração e serei eternamente grata.

À Deus, pela família maravilhosa que me deu, por ter colocado o Felipe na minha vida, por permitir que sempre estivesse rodeada de boas pessoas, por ter me guiado, permitindo que eu chegasse até aqui.

Aos meus guias espirituais e aos amigos do Centro Espírita Anjos da Guarda (Santa Teresa-ES), pela assistência, intuição, auxílio, orações, que fortaleceram minha alma, indicando os caminhos a seguir.

Ao meu pai, Jorge, que desde cedo me ensinou que o conhecimento é a única coisa que nunca nos será tirado. Obrigada por ser esse exemplo de vida, pelo pai presente e maravilhoso que você é, pela dedicação que tem por nós, seus filhos. Não sei o que seria de mim sem você.

Ao Felipe, meu noivo, com quem divido todos os momentos, pelo amor, carinho, amizade, companheirismo, compreensão. Ao seu lado, nenhum obstáculo foi tão grande que não pudesse ser transposto, nenhum momento foi tão difícil que não pudesse ser superado. Vivendo juntos, aprendemos que juntos queremos viver. Obrigada por tudo, amor!

À Liana, Mariana e Rodrigo, irmãos que amo tanto, que sempre compreenderam a minha ausência, me apoiaram e, com seu amor, transmitiram

força e um carinho sem igual, essenciais para a minha caminhada. Obrigada por existirem!

À minha mãe Luziana, que me educou e sempre me estimulou a estudar, meu carinho e gratidão eternos.

À Tia Madá, presença constante nesses últimos anos, que, mesmo a quilômetros de distância, me aconselhou, incentivou e me deu amor.

Aos meus primos Daniel, Ricardo, Lorena, Leonardo, Lohan, Vinícius e Nicole, turminha especial, que, com carinho, me auxiliaram a superar as saudades.

Aos meus avós Amélia, Maria e José, que, com suas orações, fortaleceram meu espírito e me ajudaram a superar as dificuldades. Amo vocês.

À Dodora, minha sogra, e à Vó Tina, pelas orações e bons fluidos que enviam sempre para nós.

À Cidinha, que, com seu amor incondicional, me “adotou” como filha. Não tenho palavras para agradecer. Não foi por acaso que nos encontramos nesta vida.

À Liza, minha amiga-irmã, que me deu força nesta reta final, pela amizade, pelas orações e pelas boas risadas, que me ajudam a enfrentar os momentos mais difíceis.

Aos meus amigos da Turma MKT 12, pela força e carinho. Vocês são maravilhosos!

À Sonia Cassiolato, que contribuiu muito para a minha formação profissional, como farmacêutica hospitalar que sou, e também pela grande amizade que construímos. Não sei como agradecer por tudo.

À equipe da Farmácia UE, especialmente Carlos Alberto, Rosangela, Vera, Malu e Miguel, que me ajudaram trocando plantões, apoiando e dizendo palavras incentivadoras. Aos amigos que não estão mais lá e que foram muito importantes nesta etapa: Cristina, Douglas e Alessandro. Muito obrigada pela força! Nunca esquecerei vocês!

À equipe do Centro Integrado da Qualidade, especialmente Fernanda e Susana, que permitiram a adequação de horários para que eu pudesse finalizar esse trabalho.

À Profa. Dra. Maria José, pela orientação, pelos conhecimentos compartilhados, e pela amizade. Essa etapa da minha vida foi fundamental para que eu assumisse um novo papel na vida profissional. Isso só foi possível pela oportunidade que me deu, em conhecer a pesquisa científica e, mais que isso, pelo exemplo de dedicação à pesquisa que você é. Muito obrigada!

À Profa. Dra. Vera, da Escola de Farmácia da UFOP, pela amizade, pela ajuda e confiança, e porque fez despertar em mim o interesse pelo Controle de Qualidade.

À Profa. Maria José, da Escola de Farmácia da UFOP, pelo auxílio tão importante durante a minha formação na graduação e pela confiança que teve em mim.

Às Profa. Dra. Marilisa Guimarães Lara e Profa. Dra. Carem Gledes Vargas Rechia, que formaram a comissão julgadora da minha qualificação, pelas orientações, sugestões e discussões que foram muito importantes para a conclusão deste trabalho.

Às companheiras de laboratório Ana Luiza, Carlinha, Franciane, Rúbia, Viviane e Yris, que me apoiaram, pela convivência sempre alto astral. Agradeço especialmente à Fabiana e à Sandra, que contribuíram muito para o meu trabalho com seus conhecimentos, e também foram essenciais me apoiando, estimulando, e proporcionando momentos de grande alegria, tornando-se amigas para a vida toda.

À Fátima, pela colaboração constante na confecção deste trabalho e discussões tão enriquecedoras.

Aos técnicos do laboratório, José Roberto Jabor e Luiz Henrique Cenzi, pela ajuda durante os experimentos e pela amizade.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e aos professores desta faculdade, pelos conhecimentos compartilhados e pelos bons momentos.

Aos funcionários da seção de pós-graduação, Ana, Carlos, Eleni e Rosana, pelos auxílios e boa convivência.

À Zanini, Curtis Ltda e Special Pharma, pela doação de material para o desenvolvimento do trabalho.

Sou privilegiada por ter tantas pessoas a agradecer...

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE QUADROS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
PAPAÍNA: UMA PROTEÍNA DE USO FARMACÊUTICO.....	1
1.1. Caracterização da papaína.....	1
1.2. Aplicações da Papaína.....	7
1.3. Estabilidade das proteínas em formulações.....	14
2. OBJETIVOS.....	28
A. OBJETIVO GERAL.....	28
B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1. Material.....	30
3.1.1. Reagentes.....	30
3.1.2. Equipamentos.....	30
3.2. Métodos.....	32
3.2.1. Preparo das soluções mãe das papaínas.....	32
3.2.2. Avaliação da atividade proteolítica da papaína pela hidrólise do substrato caseína.....	32
3.2.3. Validação do método de medida de atividade proteolítica.....	34
3.2.3.1. Linearidade/Faixa.....	34
3.2.3.2. Precisão e exatidão intra e inter ensaio.....	35

3.2.3.3. Limites de detecção e quantificação.....	36
3.2.4. Caracterização química, física e da atividade proteolítica das matérias-primas papaína.....	37
3.2.4.1. Determinação da quantidade de proteína pelo Método de Lowry.....	37
3.2.4.2. Avaliação da atividade proteolítica das matérias-primas papaína, por hidrólise do substrato caseína.....	37
3.2.4.3. Análise eletroforética em condições dissociantes das matérias-primas papaína.....	38
3.2.4.3.1. Procedimento eletroforético.....	38
3.2.4.3.1.a. Coloração do gel de poliacrilamida para detecção de proteínas.....	39
3.2.4.3.2. Determinação das massas moleculares relativas das bandas protéicas.....	40
3.2.5. Estudo da estabilidade da atividade proteolítica da matéria-prima papaína frente a diferentes condições de temperatura e umidade.....	40
3.2.6. Preparação de formulações tópicas do tipo gel contendo papaína.....	41
3.2.6.1. Formulação – gel de Pluronic® F127.....	41
3.2.6.2. Formulação – gel de Carbopol® 940.....	42
3.2.6.3. Formulação – gel de Natrosol® HHR.....	43
3.2.7. Avaliação prévia da estabilidade física, físico-química e da atividade proteolítica das formulações.....	44
3.2.7.1. Avaliação visual.....	45
3.2.7.2. Determinação do pH.....	45
3.2.8. Avaliação da atividade proteolítica das formulações estáveis.....	45
3.2.9. Uniformidade de conteúdo da atividade proteolítica nas formulações.....	46
3.2.10. Estudos de estabilidade física, físico-química e da atividade proteolítica..	46
3.2.10.1. Estabilidade físico-química das formulações estocadas.....	47
3.2.10.2. Estabilidade da atividade proteolítica da papaína incorporada às formulações.....	47
3.2.10.3. Avaliação da eficácia da papaína para uso tópico <i>in vitro</i>	48

4. RESULTADOS.....	49
4.1. Método de medida da atividade proteolítica da papaína padrão/Validação do método.....	49
4.1.1. Medida da atividade proteolítica/Curva de Calibração.....	49
4.1.2. Precisão e exatidão intra e interensaio.....	51
4.1.3. Determinação dos limites de detecção e quantificação.....	54
4.2. Caracterização física, química e da atividade proteolítica da papaína nas matérias-primas.....	55
4.3. Análise eletroforética em condições dissociantes da papaína padrão Sigma e das matérias-primas papaína dos fabricantes A e B.....	58
4.4. Estudo da estabilidade da atividade proteolítica das matérias-primas papaína armazenada em diferentes condições de temperatura e umidade....	60
4.5. Preparo e avaliação física, físico-química, da atividade proteolítica das formulações contendo papaína e avaliação <i>in vitro</i> da eficácia da ação proteolítica da papaína nas formulações.....	64
4.5.1. Avaliação física e físico-química das formulações.....	64
4.5.2. Avaliação da atividade proteolítica.....	65
4.5.2.1. Interferência dos componentes das formulações na medida da absorvância em 280 nm.....	65
4.5.2.2. Dosagem de atividade proteolítica das formulações.....	66
4.5.2.3. Avaliação da uniformidade de conteúdo de atividade proteolítica das formulações.....	67
4.5.3. Estudo da estabilidade física, físico-química e da atividade proteolítica das formulações com e sem a matéria-prima papaína A.....	68
4.5.4. Avaliação <i>in vitro</i> da eficácia da ação proteolítica da papaína em formulações tópicas.....	73
5. DISCUSSÃO.....	74
6. CONCLUSÕES.....	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Configuração tridimensional da papaína, na qual estão representados os dois domínios da cadeia principal e o sítio catalítico ao meio.....	4
Figura 2 - (A) Papaína: resíduos do sítio catalítico (Cis 25 e His 159); (B) Configuração tridimensional da papaína.....	5
Figura 3 - Esquema bi-dimensional da ligação de um substrato ao sítio ativo da Papaína.....	5
Figura 4 - Esquema da formação de agregados da Papaína.....	18
Figura 5 - Estrutura química dos poloxâmeros.....	25
Figura 6 - Variação da absorvância a 280 nm por minuto de reação em função da concentração de papaína no meio reacional (em microgramas/mL).....	33
Figura 7 - Esquema da montagem do gel para avaliação da eficácia <i>in vitro</i> da papaína para uso tópico.....	48
Figura 8a - Curva representativa do aumento da absorvância a 280 nm por minuto de reação em função da concentração de papaína ($\mu\text{g/mL}$) no meio reacional.....	50
Figura 8b - Relação linear entre aumento da absorvância em 280 nm em função da concentração de papaína ($\mu\text{g/mL}$) no meio reacional.....	50
Figura 9 - Representação gráfica do aumento da absorvância por minuto de reação em função da concentração de proteína para as matérias-primas papaína dos fabricantes A e B e das duas matérias-primas	57
Figura 10 - Análise eletroforética em placa de gel de poliacrilamida com SDS, da papaína padrão sigma, da papaína matéria-prima A, da papaína matéria-prima B e da mistura de padrões protéicos de MMr.....	59
Figura 11 - Relação linear entre o logarítmo das MMr dos padrões protéicos e as respectivas mobilidades eletroforéticas (R_f).....	59
Figura 12 - Aspecto visual da matéria-prima papaína A armazenada a 40°C/ 70% UR, nos tempos zero, 15 e 30 dias de armazenamento.....	60
Figura 13 - Medida do aumento de absorvância por minuto de reação em função da concentração de papaína A e papaína B no meio reacional ($\mu\text{g/mL}$), armazenadas a 4°C, 30°C-70%UR e 40°C-70%UR, nos tempos zero, 15 e 30 dias.....	62

Figura 14 - Interferência dos componentes das formulações na medida da absorvância em 280 nm.....	65
Figura 15 - Avaliação visual das formulações géis de Pluronic® F127 e Carbopol® 940 contendo 1% de papaína A, submetidas a diferentes condições de armazenamento, nos tempos zero, 15, 30 e 60 dias.....	69
Figura 16 - Medida da atividade proteolítica (U) da papaína na matéria-prima A e veiculada nas formulações géis de Pluronic® F127 e de Carbopol® 940 em função do tempo, armazenados a 4°C, 30°C/70%UR e 40°C/70%UR.....	71
Figura 17 - Avaliação <i>in vitro</i> da eficácia da ação proteolítica da papaína em formulações tópicas pela degradação da gelatina adicionada a gel de poliacrilamida.....	73

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Componentes dos géis de concentração e separação para a eletroforese em condições dissociantes.	38
Quadro 2 - Componentes utilizados no preparo das formulações de Poloxamer 407 (Pluronic® F127) contendo papaína.....	41
Quadro 3 - Componentes utilizados no preparo das formulações de Carboximetilcelulose (Carbopol 940®).....	42
Quadro 4 - Componentes utilizados no preparo das formulações com Hidroxietilcelulose (Natrosol® 250 HHR).....	43
Quadro 5 - Componentes do gel para os estudos de eficácia <i>in vitro</i>	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Resultados da análise de regressão linear dos dados da curva obtida pela relação entre o aumento da absorvância por minuto de reação (280 nm) em função da concentração de papaína ($\mu\text{g/mL}$) no meio reacional	50
Tabela 2- Determinação da repetibilidade do método de medida da atividade proteolítica da papaína, empregando a caseína como substrato (3 concentrações com 10 réplicas).....	52
Tabela 3- Determinação da precisão interensaio do método de medida da atividade proteolítica da papaína, empregando a caseína como substrato, na concentração de 8,34 $\mu\text{g/mL}$ de papaína, com 5 réplicas.....	52
Tabela 4- Determinação da precisão interensaio do método de medida da atividade proteolítica da papaína, empregando a caseína como substrato, na concentração de 11,12 $\mu\text{g/mL}$ de papaína, com 5 réplicas.....	53
Tabela 5- Determinação da precisão interensaio do método de medida da atividade proteolítica da papaína, empregando a caseína como substrato, na concentração de 13,90 $\mu\text{g/mL}$ de papaína, com 5 réplicas.....	53
Tabela 6- Determinação da exatidão intraensaio ($n=10$) e interensaio ($n=5$) do método de medida da atividade proteolítica da papaína, empregando a caseína como substrato, para três concentrações de papaína.....	54
Tabela 7- Valores de precisão e exatidão intra e interensaio calculados para o limite de quantificação determinado experimentalmente pelo método de medida da atividade proteolítica da papaína, utilizando a caseína como substrato.....	55
Tabela 8- Medida da concentração de proteína total nas matérias-primas papaína comercializadas pelos fabricantes A e B.....	56
Tabela 9- Medida do aumento da absorvância por minuto de reação em função da concentração de proteína ($\mu\text{g/mL}$), no meio reacional, para matérias-primas dos fabricantes A e B.....	56
Tabela 10- Medidas de atividade proteolítica em unidades de atividade proteolítica (U) da papaína dos fabricantes A e B, por microgramas de proteína e miligramas de matéria-prima.....	58
Tabela 11- Massa molecular relativa (MM_r) obtida para os componentes protéicos detectados para as diferentes amostras de papaína.....	61
Tabela 12- Medida da atividade proteolítica em unidade de atividade (U) por miligrama da matéria-prima A, armazenada a 4°C, 30°C/70%UR e 40°C/70%UR, em diferentes tempos.....	63

Tabela 13- Medida da atividade proteolítica em unidade de atividade (U) por miligrama da matéria-prima B, armazenada a 4°C, 30°C/70%UR e 40°C/70%UR, em diferentes tempos.....	63
Tabela 14- pH das formulações preparadas com 1% de papaína A.....	64
Tabela 15- Quantidade de unidade de atividade proteolítica extraída de 1 grama das formulações.....	66
Tabela 16- Recuperação da atividade proteolítica adicionada às formulações	66
Tabela 17- Uniformidade do conteúdo de atividade proteolítica das formulações gel Pluronic® F127 e de Carbopol® 940.....	67
Tabela 18- Determinação dos valores de pH das formulações géis de Pluronic® F127 e Carbopol® 940 durante o período de armazenamento a 4°C, 30°C/70% UR e 40°C/70% UR.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cm (1×10^{-2} m).....	centímetros
mm (1×10^{-3} m).....	milímetros
L (1×10^{-3} m ³).....	litros
mL (1×10^{-3} L).....	mililitros
mM (1×10^{-3} mol x L ⁻¹).....	milimolar
M ($1 \times$ mol x L ⁻¹).....	molar
g (1×10^{-3} Kg).....	grama
mg (1×10^{-6} Kg).....	miligrama
µg (1×10^{-9} Kg).....	micrograma
p/p.....	peso/peso
p/v.....	peso/volume
q.s.p.	quantidade suficiente para
rpm.....	rotação por minuto
°C.....	graus Celsius
EDTA.....	Ácido etilenodiaminotetracético (ácido edético)
HCl.....	Ácido clorídrico
NaOH.....	Hidróxido de Sódio
SDS.....	Dodecil sulfato de sódio (lauril sulfato)
TEMED.....	N, N, N', N', tetrametiletilenodiamina
Tris.....	Tris(hidroximetil)amino-metanohidrocloreto
TCA.....	Ácido Tricloracético
UV.....	Ultra - violeta

RESUMO

CAPUCHO, H.C. **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo papaína para o tratamento de feridas.** 2007. 102 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

O presente trabalho avaliou, por medida de conteúdo protéico, análise eletroforética, por determinação da atividade proteolítica e verificação da estabilidade dessa atividade, matérias-primas papaína de dois fabricantes. Formulações géis de Carbopol® 940, Natrosol® 250 HHR e Pluronic® F127, contendo matéria-prima papaína a 1%, foram desenvolvidas e avaliadas quanto à estabilidade e a eficácia *in vitro* da atividade proteolítica. Os estudos de estabilidade foram conduzidos por medida da atividade proteolítica da papaína, utilizando a caseína como substrato, em amostras armazenadas sob diferentes condições de temperatura e umidade. A eficácia da ação proteolítica *in vitro* foi avaliada em gel de poliacrilamida, contendo gelatina como substrato. A matéria-prima do fabricante B apresentou maior conteúdo protéico e maior atividade proteolítica do que a matéria-prima do fabricante A. Ambas matérias-primas demonstraram estabilidade da atividade funcional, quando armazenadas a 4°C, por um período de 6 meses. Quando armazenadas a 30°C/70%UR e a 40°C/70%UR, houve perda acentuada dessa atividade. A medida da atividade proteolítica das formulações, após 48 horas de sua preparação, mostrou que apenas 8% da atividade funcional total foi detectada. Este resultado pode indicar interação entre a papaína e os componentes das formulações, levando a uma perda da atividade proteolítica, ou uma redução da velocidade da reação enzimática. Os estudos da estabilidade da atividade funcional mostraram que ambas formulações foram estáveis, quando armazenadas a 4°C, por 6 meses. Entretanto, quando armazenadas a 30°C/70%UR e a 40°C/70%UR, foi observada rápida redução da atividade proteolítica, em função do tempo de armazenamento. A avaliação da atividade proteolítica das formulações em gel de poliacrilamida, adicionado de gelatina como substrato, após 6 horas de incubação a 37°C, demonstrou que a formulação gel de Carbopol® 940 foi a mais eficaz, até mesmo superior à formulação extemporânea de matéria-prima papaína 1%, em solução aquosa. Este resultado evidencia que esse polímero foi o mais adequado para veicular a papaína. Além disso, foi o que apresentou maior eficácia proteolítica no teste *in vitro*. Dessa forma, esta formulação poderá ser empregada para auxiliar o processo de cicatrização de feridas e queimaduras, nos diferentes níveis assistenciais de saúde, com garantia de eficácia, segurança e qualidade.

Palavras-chave: papaína, atividade proteolítica, estabilidade, feridas.

ABSTRACT

CAPUCHO, H.C. **Development of topical formulations containing papain to wounds treatment.** 2007. 102 f. Dissertation (Master) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

The present work evaluated by content of protein measurement, electrophoresis, proteolytic activity determination and verification of this activity stability, raw materials of papain obtained from two manufacturers. Gel formulations of Carbopol® 940, Natrosol® 250 HHR and Pluronic® F127, and containing 1% of papain, were developed and evaluated with regard to stability and *in vitro* efficacy of proteolytic activity. The stability studies were conducted by papain proteolytic activity measurement, using casein as substrate and the samples were stored under different conditions of temperature and humidity. The *in vitro* efficacy of proteolytic activity was evaluated using polyacrylamide gel containing gelatin as substrate. The raw material obtained from manufacturer B showed higher content of protein and higher proteolytic activity than the one from manufacturer A. Both raw materials showed functional stability when stored at 4°C during 6 months. When stored at 30°C/70% RH and at 40°C/70% RH, there was significant loss of these activities. The measure of formulations proteolytic activity, after 48 hours from its preparation, showed that only 8% of the total activity was detected. This result might indicate possible interactions between papain and formulation components, which lead to a loss in the proteolytic activity or a reduction in the speed of enzymatic reaction. The functional stability studies showed that all formulations were stable when stored at 4°C during 6 months. However, when stored at 30°C/70%RH and 40°C/70%RH, it was observed fast decrease in the proteolytic activity as a function of storage time. The evaluation of formulations proteolytic activity in polyacrylamide gel, added with gelatin as substrate, after 6 hours of incubation at 37°C, showed that Carbopol® 940 gel formulation was the most efficient, being also better than the formulation recently prepared with 1% of papain raw material in aqueous solution. This result demonstrates that this polymer was the most adequate to be incorporated with papain. Besides this, it was the one that showed higher proteolytic efficacy in the *in vitro* test. Then, this formulation might be employed to help in the wound and burns cicatrization process, in the different levels of health assistance, with efficacy, security and quality guarantee.

Keywords: papain, proteolytic activity, stability, wounds.

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

Papaína: uma proteína de uso farmacêutico

1.1. Caracterização da papaína

Uma variedade de plantas produz endopeptidases como parte do seu metabolismo protéico. O látex do fruto verde do *Carica papaya* Linne, por exemplo, contém uma mistura de cisteínas endopeptidases, como a papaína (EC 3.4.22.2), as quimopapaínas A e B (EC 3.4.22.6), a endopeptidase papaia III, a endopeptidase papaia IV e, acredita-se que, uma outra designada como endopeptidase Ω (MORAES; TERMIGNONI; SALAS, 1994).

Carica papaya L. é intensamente cultivada nas regiões do trópico e subtropical, por possuir frutos comestíveis e enzimas estocadas em seus veios de látex. Os veios de látex estão arranjados em todas as partes aéreas da planta, formando uma densa rede de estruturas articuladas. Danos às folhas da planta do papaia, inevitavelmente, rompem os veios de látex, liberando-o (ROTH; CLAUNSITZER, 1972).

O látex do papaia é um fluido tixotrópico, com uma aparência leitosa, que contém cerca de 15% de matéria seca. Quarenta por cento dessa matéria é constituído por enzimas, principalmente cisteínas endopeptidases, que, somadas, correspondem a mais de 80% da fração total de enzimas (AZARKAN et al., 2003).

As endopeptidases do papaia constituem um perigo em potencial para a planta. Entretanto, estão presentes nos veios do látex como pró-formas inativas que,

rapidamente, são convertidas em enzimas ativas, depois da liberação do látex pela planta (SILVA et al., 1997; MOUTIM et al., 1999).

Embora a papaína (EC 3.4.22.2) seja o menor constituinte (cerca de 8%) dentre as endopeptidases do mamão, foi a mais facilmente purificada. O interesse pela papaína foi estimulado pela observação de que o cianeto exercia um efeito de ativação sobre a enzima. O estudo deste efeito culminou com a idéia acerca da importância dos grupos tióis na ação enzimática, como, também, possibilitou o desenvolvimento do conhecimento a respeito da especificidade das proteinases (MITCHEL; CHAIKEN; SMITH, 1970).

A papaína foi cristalizada a partir do látex fresco por Balls, Lineweaver e Thompson, em 1937. Este processo foi melhorado, em escala preparativa, por Balls e Lineweaver (1939), porém não foi intensamente usado devido à escassez e ao alto custo do látex fresco (MONETTA, 1987; ROGENSKI et al., 1995). O princípio ativo proveniente do látex das folhas e frutos do mamão verde adulto do *Carica papaya* Linne (família Caricaceae), foi primeiramente denominado de “carnicina” e, em 1876, Peckolt isolou esse princípio ativo e o denominou de “papaiotina”. Entretanto, coube a Wutz, em 1880, empregar a denominação “papaína” (HWANG; IVY, 1951; KLASSEN, 2000; MONETTA, 1987).

Kimmel e Smith (1957) obtiveram a papaína cristalina do látex seco, de forma rápida e econômica, em bom nível de pureza, por modificação do procedimento descrito por Balls e Lineweaver (1939). Outras propriedades da papaína foram determinadas, como a baixa massa molecular e a baixa estabilidade enzimática, sob condições extremas, que permitiram, em 1970, caracterizá-la cinética e estruturalmente. A papaína é uma tiol proteinase constituída de uma única cadeia polipeptídica contendo 212 resíduos de aminoácidos, com uma massa molecular de

23400 Daltons e um ponto isoelétrico de 9,5 (SANGEETHA; ABRAHAM, 2006). Estudos bioquímicos e biofísicos, tais como cristalografia de raio-x, mapa de densidade eletrônica e seqüência de aminoácidos, e extensivos estudos cinéticos têm permitido a elucidação da sua estrutura funcional.

A molécula da papaína consiste de uma cadeia polipeptídica simples. Light et al. (1964, *apud* ARNON, 1970)¹ foram os primeiros a reportar a seqüência de aminoácidos dessa enzima, descrevendo a indicação da posição das ligações dissulfetos na molécula, bem como do grupo sulfidril ativo. A estrutura cristalina tridimensional da papaína indica que a cadeia polipeptídica é dobrada em dois domínios de tamanhos semelhantes, mas com conformações completamente diferentes, formando uma fenda sobre a superfície da enzima, onde está localizado o seu sítio ativo (Figura 1) (FERHST, 1980; KAMPHUIS et al., 1984; NAEEM; FATIMA; KHAN, 2006). Os resíduos de aminoácidos cisteína na posição 25 (Cis 25), histidina na posição 159 (His 159) e asparagina (Asn 175) na posição 175 estão localizados na superfície dessa fenda entre os dois domínios da molécula. O grupo sulfidrílico está localizado na posição Cis 25, enquanto que os outros seis resíduos de cisteína formam três ligações dissulfeto (SZABÓ et al., 2006).

A conformação estrutural da papaína é estabilizada por essas ligações dissulfeto que, uma vez destruídas, levam à redução da atividade biológica, catalítica e imunológica da enzima (ZHUANG; BUTTERFIELD, 1991). A papaína cliva, preferencialmente, ligações peptídicas envolvendo aminoácidos básicos e, também, possui atividade esterásica.

¹LIGHT, A.; FRATER, R.; KIMMEL, J.R.; SMITH, E.L.. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* v. 52, p. 1276, 1964.

Figura 1 - Configuração tridimensional da papaína, na qual estão representados os dois domínios da cadeia principal (em verde) e o sítio catalítico ao meio (em azul). (UNIVERSITY OF RONINGEN²)

Na papaína, a parte da cadeia em que se localiza a Cys 25 e His 159 é o sítio ativo da enzima (Figura 2), e a interação entre esses aminoácidos é responsável pelo mecanismo catalítico sobre o substrato (Figura 3) (BROCKELEHURST, 1990; GOLAN et al., 2000). Os autores Sangeetha e Abraham (2006), entretanto, afirmam que o centro catalítico da enzima é formado por uma tríade composta pelos resíduos de aminoácidos Cys 25, His 159 e Asn 175.

²UNIVERSITY OF RONINGEN, pesquisa realizada em 16/05/2006.
<http://www.rug.nl/scheikunde/onderzoek/programmas/proteinCrystallography/gallery/index?lang=en>

Figura 2 – (A) Papaína: resíduos do sítio catalítico (Cis 25 e His 159). (TURK,B.; TURK,V.; TURK,D., 1997³).

(B) Configuração tridimensional da papaína, na qual está representada a Cisteína 25, do sítio ativo da papaína. (UNIVERSITÉ FRANÇOIS RABELAIS⁴)

Figura 3 - Esquema bi-dimensional da ligação de um substrato ao sítio ativo da Papaína. (TURK,B.; TURK,V.; TURK,D., 1997⁵).

^{3,5}TURK,B.; TURK,V.; TURK,D.. Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. **Biol. Chem.** v. 378, p. 141-150.1997.

⁴UNIVERSITÉ FRANÇOIS RABELAIS, pesquisa realizada em 15/05/2006.

<http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/Images/pap.jpeg>

As enzimas da classe da cisteína, na qual a papaína está incluída, formam uma ligação covalente tioéster entre um grupamento acila do substrato e o grupamento sulfidrílico de um resíduo específico de cisteína, no sítio ativo da enzima (LEHNINGER, 2000). A papaína é uma enzima que requer esse grupo sulfidrílico livre para a sua ação catalítica. A ativação pode ser conseguida com a adição de um agente redutor como a cisteína, sulfitos, ciamida, cianeto de hidrogênio, glutatona reduzida e tioglicolato. A inativação dessa proteína, por sua vez, pode acontecer na presença de ar, ácidos concentrados, aumento de temperatura, e é acelerada pela presença de metais pesados. Um meio contendo cisteína e EDTA tem sido usado como padrão para ativação da papaína e para evitar sua inativação, respectivamente (KIMMEL; SMITH, 1954; ARNON, 1970; MONETTA, 1988; MERCK INDEX, 1996; USP XXIX, 2006).

A papaína destaca-se por sua especificidade relativa a proteínas e substratos de baixa massa molecular. Pesquisas demonstraram que a maioria das ligações peptídicas é hidrolisada com intensidade variada pela papaína, sendo as mais suscetíveis aquelas formadas por grupos α -amino substituído (KIMMEL; SMITH, 1954).

A papaína purificada é encontrada sob a forma de um pó higroscópico, de coloração variando desde o branco até o amarelado. Apresenta-se, comercialmente, diluída com lactose ou outros diluentes (MERCK INDEX, 1996; USP XXIX, 2006). Solúvel em água, a papaína origina solução incolor ou amarelada, pouco opalescente. É praticamente insolúvel em álcool, clorofórmio e éter. Uma solução a 2% (p/v) de papaína tem pH entre 4,8 a 6,2 (USP XXIX, 2006).

1.2. Aplicações da Papaína

A papaína, devido à sua atividade, tem aplicação em diversas indústrias, na medicina, na odontologia e como ferramenta em pesquisas.

Na indústria de alimentos é utilizada na fabricação de queijos e biscoitos, como amaciante de carne e clareador de cervejas (BERSIN, 1957; CHAMBERS et al., 1998; MARTINDALE, 2005; MONETTA, 1987; PARK et al., 1980; SAID; PIETRO, 2004; SASMITO; DEMEESTER; BRACKE, 1982). Na produção de detergentes a papaína é adicionada para aumentar o poder de limpeza pela degradação hidrolítica de proteínas presentes em manchas de sangue, ovo, chocolate, entre outras. Na industrialização do couro, a papaína é empregada no processo de remoção dos pêlos e amaciamento do couro, agindo na degradação do colágeno (SASMITO; DEMEESTER; BRACKE, 1982).

Na indústria cosmética, a papaína é um potente ingrediente ativo adicionado às preparações esfoliantes, devido à sua capacidade de hidrolisar ligações peptídicas de colágeno e queratina no estrato córneo da pele, removendo, assim, os debris celulares da epiderme (NIINIMAK et al., 1993). A aplicação da papaína foi estudada por Traversa (2003) como agente depilatório, e já está sendo utilizada para “peeling” (SANTOS, 2001), além do uso associado a alfa-hidroxiácidos e ao ácido acetilsalicílico no tratamento de rugas, flacidez e ressecamento da pele (OZLEN, 1996). No mercado existem produtos contendo papaína combinada com outras substâncias, tais como uréia e clorofila. Essa preparação está sendo comercializada com o nome de Panafil® (KLASEN, 2000). Além dessa, há a Accuzime®, adicionada de papaína e uréia, e o produto italiano NouriFusion®, contendo papaína e as vitaminas A, C e E.

LOPES (2003) menciona que a enzima é segura e eficaz quando utilizada como promotor de absorção cutâneo. Um possível mecanismo de ação da papaína no estrato córneo poderia ser a competição entre a papaína e a transglutaminase, responsável pela formação do envelope cornificado ao redor dos corneócitos.

Na odontologia, a papaína está sendo incorporada à formulação gel para remoção química da cárie, principalmente para aplicação na odontopediatria. No comércio existe o produto Papacárie®, que promove a remoção do tecido cariado e infectado, preservando, ao máximo, os tecidos saudáveis adjacentes do dente, sem ocasionar qualquer dano aos tecidos da boca (SILVA, 2005). Duarte et al. (2001) defendem a utilização da papaína na odontologia como agente tópico irrigador em tratamento de canais. Outra utilização da enzima é na remoção do tártaro, pelo amolecimento do mesmo e diminuindo, assim, o desconforto do procedimento (DAVANÇO, 2004).

A indústria farmacêutica tem explorado as propriedades proteolíticas da papaína, principalmente em medicamentos de usos oral e tópico. Os medicamentos de uso oral contendo papaína são comercializados como digestivos, auxiliando na degradação das proteínas da dieta, como o Filogaster®, contendo pancreatina, diastase e papaína (DEF, 2002; WALSH; HEADON, 1994). Tem sido estudado, ainda, o uso oral dessa enzima na prevenção de aderências intrabdominais pós-operatórias, por se tratar de um agente fibrinolítico (HELFEBREKERS et al., 2000), no tratamento da mucosite, como antiinflamatório (MALHOTRA; VARMA, 2002), no tratamento de infecções de vísceras, atuando como promotor de absorção de antibióticos (BOCK et al., 1998; GUGGI; BERNKOP-SCHNÜRCH, 2005; ROGENSKI et al., 1995).

A maior parte das aplicações clínicas da papaína de uso tópico objetiva o desbridamento de feridas e de queimaduras, de modo a acelerar o processo de cicatrização dessas lesões.

O desbridamento com proteases tem sido proposto para uma rápida remoção, não traumática, do material protéico não desejável das lesões, apresentando a vantagem de oferecer poucos riscos ao paciente (AYELLO; CUDDIGAN, 2004; LAIDET; LETOUNEUR, 1993; MONETTA, 1990).

A retirada de tecidos desvitalizados é de fundamental importância na cicatrização de feridas e queimaduras, pois a maior ameaça para o paciente é a presença de tecido inviável que abriga, aquece e estimula a proliferação de microrganismos, os quais retardam a regeneração do tecido e podem determinar sepse invasiva (PELLON, 1995; OZCAN et al., 2002).

Embora a reparação tecidual seja um processo sistêmico, é necessário favorecer as condições locais por terapia tópica.

O uso de enzimas exógenas para o desbridamento de feridas pode acelerar a limpeza e o processo de cicatrização. Isso diminui o tempo de hospitalização e a necessidade de intervenção cirúrgica (TIRAS et al., 2005). Mandelbaum S., Santis e Mandelbam M. (2003) indicam a papaína em todas as fases do processo de cicatrização, sejam feridas secas ou exsudativas, colonizadas ou infectadas, com ou sem áreas de necrose.

A papaína promove o alinhamento das fibras que compõem o colágeno, proporcionando o crescimento uniforme do tecido, resultando em uma cicatriz mais plana (MONETTA, 1990; SANCHEZ NETO, 1991). Masini e Calano (1986) afirmam que isso acontece porque a papaína neutraliza as interações entre os aminoácidos aglomerados em forma espiralar e que se dispõem aleatoriamente, intervindo na

ruptura dessas ligações, fazendo com que os aminoácidos se disponham em cadeias lineares, evitando, assim, a formação de quelóides, que é um aglomerado aleatório de fibras que formam o tecido conjuntivo.

Flindt (1978) sugere que a papaína aja apenas no tecido lesado, devido à ausência de uma anti-protease plasmática, a α_1 -anti-tripsina, que impede a ação proteolítica da enzima em tecidos sadios.

Otuka, Pedrazzani e Pioto (1996) afirmaram que soluções extemporâneas de papaína são de grande auxílio no tratamento da úlcera plantar, acelerando ou evoluindo o processo de cicatrização. Lesões, contendo ou não tecido necrosado, cicatrizam mais rapidamente utilizando a papaína, como é o caso de úlceras diabéticas, de pressão ou venosas (MEKKES, 1997; METRIONE, 1981; MONETTA, 1987, 1990, 1992; UDOD; STOROJUK, 1981, *apud* SANCHEZ NETO, 1991⁶). Rocha, Gurjão, Brito Junior (2005) e Sanchez Neto (1991), ressaltam que as feridas tratadas com a enzima apresentam maior número de fibroblastos e que a matriz colágena é organizada, o que é muito importante na força de tensão e integridade local da reparação.

No tratamento de queimaduras, também tem sido utilizado enzimas proteolíticas e, dentre elas, a papaína, que demonstrou bons resultados na cicatrização deste tipo de ferimento, incluindo pacientes com as chamadas queimaduras elétricas (FERREIRA, 2003; KLASSEN, 2000; MASINI; CALAMO, 1986; ÖZCAN, 2002; PIEPER; CALIRI, 2003). Com o uso de uma solução contendo 0,2% da enzima em áreas feridas, Udod e Storojuk⁷ (1981 *apud* SANCHEZ NETO, 1991) observaram que a papaína abreviou o tempo de limpeza das feridas e das massas necróticas, facilitando a liquefação e retirada de secreção purulenta em todos os

^{6,7}UDOD, V.M.; STOROJUK, V.T.. Use of papain in treating suppurative portoperative soft tissue complications and diseases. *Khirurgiya*, Moskou. V. 5, p. 99-101. 1981.

pacientes, ativando os processos de regeneração e encurtando o período de cicatrização. Além disso, constataram uma reação inflamatória menos intensa, com redução do edema.

A papaína demonstra ter diversas vantagens sobre os outros agentes tópicos empregados: fácil aplicação, única em cada dia de tratamento para a maioria dos pacientes, o que facilita os cuidados da enfermagem; é bem tolerada por crianças, que são as maiores vítimas de queimaduras; além da vantagem econômica, em virtude do seu baixo custo (PIEPER; CALIRI, 2003; SERRA, 1995; STARLEY, 1999).

Entretanto, a maior vantagem desde o início do uso tópico da papaína em queimaduras é que, mesmo em queimaduras mais densas, o desbridamento cirúrgico raramente é necessário (STARLEY, 1999). A papaína se enquadra no conceito de desbridamento ideal de Rosemberg et al. (2004), pois é um agente tópico que propicia resultados rápidos, é seguro e desbrida tecidos necróticos com pouco ou nenhum dano ao tecido sadio.

A papaína pode ser adquirida como uma preparação magistral, sendo utilizada em pó ou pasta. Na forma de pó deve ser preparada imediatamente antes da realização do curativo em concentrações que variam de acordo com a característica da ferida (BLANES, 2004). Concentrações diferentes de papaína, para cada fase de uma lesão tecidual, são importantes para a obtenção de um resultado final satisfatório com a cicatrização e reepitelização da área lesada (ROCHA; GURJÃO; BRITO Junior, 2005). Além disso, gel de papaína a 3% é utilizado para o pré-tratamento das feridas (desbridamento químico), antes de serem administrados alguns medicamentos (GODOY; PRADO, 2005).

Várias são as formas farmacêuticas utilizadas para o auxílio da cicatrização de lesões da pele, como solução contendo papaína de 2% a 5% (KLASEN, 2000) e gel,

de 1% a 4% (PIEPER; CALIRI, 2003). Há hospitais que utilizam papaína em forma de pó e gel, como é o caso do Hospital Santa Marcelina, localizado na zona norte de São Paulo, que utiliza o gel nas concentrações de 2%, 4%, 6% e 8% (HOSPITAL SANTA MARCELINA, 2005), e do Hospital do Servidor Público Estadual, também de São Paulo, que utiliza o pó de papaína para o desbridamento químico, que é aplicado em necrose preta ou amarela por 15 minutos, lavando com soro e, em seguida, aplicando o gel de papaína. O gel utilizado é o Carboximetilcelulose (CMC) a 2%, 4%, 6% e 10%. Lobão⁸ afirma que é utilizada a papaína por sua ação bactericida e bacteriostática, ação antiinflamatória, por auxiliar acelerando a angiogênese e a migração dos fibroblastos para o local, contribuindo para um processo de cicatrização mais rápido. O gel a 2% é utilizado em tecido de granulação tipo 2 e 4, o gel a 6% é utilizado em esfacelo e é trocado a cada 12 horas, e o 10 % é utilizado em necrose seca. A Prefeitura de Londrina (Paraná) possui em sua relação de medicamentos, distribuídos à população, o gel creme contendo papaína a 4% (LONDRINA, 2005).

A aplicação da papaína em queimaduras é feita na forma do pó diretamente na lesão, pó misturado com gel, água estéril ou solução salina (PIEPER; CALIRI, 2003), e até mesmo em misturas mais complexas, como a de trietanolamina, ácido oléico, ácido esteárico e óleo mineral (KLASEN, 2000).

Atualmente, na região de Ribeirão Preto, o uso da papaína é bastante difundido, seja na forma de pó puro ou em preparações extemporâneas com água para injeção, seja veiculada em cremes, pomadas ou géis. Grandes farmácias de manipulação de Ribeirão Preto produzem essas formulações para hospitais do município e região, para asilos, entidades que cuidam de pessoas deficientes e de

⁸Informação fornecida por Lobão, em São Paulo, 2007.

famílias carentes (informação verbal)^{9,10,11}. As formulações, geralmente contendo de 1% a 4% de papaína, são comercializadas, principalmente, para o tratamento e prevenção de escaras, mas também no auxílio da cicatrização de feridas crônicas, como as do pé diabético, infectadas ou não, além de queimaduras de pequena extensão (informação verbal)^{12,13}.

Em algumas prefeituras da região, são feitos curativos em pacientes das unidades básicas de saúde com gel contendo papaína. Os curativos são feitos nos casos de escaras, ferimentos com a cicatrização comprometida e em pacientes com pé diabético. Ribeiro (2006) afirma que a cicatrização dos ferimentos é alcançada com êxito (informação verbal)¹⁴.

O Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP/USP) é referência na região no tratamento de queimaduras, possuindo uma unidade para o tratamento de pacientes queimados localizada na Unidade de Emergência (U.E.) desse hospital. O primeiro uso da papaína nessa unidade foi pela utilização de mamão verde ralado, na década de 80. Esse uso foi descontinuado pelas dificuldades de encontrar e preparar o mamão verde, além de não ser uma aplicação asséptica, condição necessária para o tratamento desse tipo de lesão. A comercialização da papaína em pó permitiu, então, a substituição do mamão ralado, sendo aplicado diretamente nas queimaduras. Utilizava-se a papaína nos casos de necrose em queimaduras de 2º grau profundo e com presença de fibrina. Ferreira (2006) afirma que havia melhora desses ferimentos. Hoje não é usada a enzima na Unidade de Queimados do

⁹Informação fornecida por Gallo, em Ribeirão Preto, 2006.

¹⁰Informação fornecida por Silva, em Ribeirão Preto, 2006.

¹¹Informação fornecida por Oliveira, em Ribeirão Preto, 2006.

¹²Informação fornecida por Seixas, em Ribeirão Preto, 2006.

¹³Informação fornecida por Santos Junior, em Ribeirão Preto, 2006.

¹⁴Informação fornecida por Ribeiro, em Ribeirão Preto, 2006.

HCFMRP/USP, porém há o interesse no estudo de novas formulações com princípios ativos naturais e menos onerosos, pois os medicamentos utilizados estão entrando em desuso e o hospital está encontrando dificuldades em substituí-los (informação verbal)¹⁵, e, ainda, há a intenção de testar a papaína e padronizá-la nesse hospital para a prevenção de escaras (informação verbal)¹⁶.

Apesar de ser proposto o uso da papaína em diversas formulações, há poucos estudos que controlam as condições sob as quais esses produtos devem ser utilizados (PIEPER; CALIRI, 2003).

1.3. Estabilidade das proteínas em formulações

A transformação ocorrida na produção de medicamentos com o desenvolvimento da indústria farmacêutica após a Segunda Guerra Mundial, acarretou grandes mudanças sob o ponto de vista da estabilidade dos produtos farmacêuticos (EV, 2001).

O termo estabilidade, em relação à forma farmacêutica, refere-se à integridade química e física da unidade dosada e, quando apropriado, à habilidade da forma farmacêutica em manter a proteção contra a contaminação microbiológica (USP XXIX, 2006). Os estudos de estabilidade são necessários a todos os produtos farmacêuticos, para que a pureza, inocuidade, potência e eficácia de um produto sejam garantidos até o momento de sua utilização (CARVALHO et al., 2005). Esses estudos constituem parte integrante do desenvolvimento de formas farmacêuticas e

¹⁵Informação fornecida por Ferreira, em Ribeirão Preto, 2006.

¹⁶Informação fornecida por Cassiolato, em Ribeirão Preto, 2006.

fornece indicações sobre o comportamento do produto frente a condições ambientais a que possa ser submetido, em determinado intervalo de tempo. As informações geradas são utilizadas na determinação do prazo de validade dos fármacos e produtos, além das recomendações de armazenamento dos mesmos (SINGH, 1999a).

Os parâmetros de estabilidade de um medicamento podem ser influenciados pelas condições ambientes de armazenamento (temperatura, luminosidade, oxigênio, e umidade), bem como pelos componentes da embalagem (DAGAR, 1990; USP XXIX, 2006). A temperatura é um dos principais fatores causadores da instabilidade dos fármacos e produtos farmacêuticos, pois pode fornecer energia para acelerar as reações químicas de degradação.

As proteínas são mais suscetíveis à instabilidade física e química, quando comparada aos fármacos tradicionais, devido à sua complexa estrutura molecular.

Todas as moléculas protéicas são formadas por cadeias heterogêneas não ramificadas de aminoácidos, que se denominam estrutura primária. As cadeias polipeptídicas sofrem um processo químico de dobramento que envolve o arranjo espacial de aminoácidos (AAs) próximos entre si, na sequência primária de AAs, formando a estrutura secundária. A estrutura terciária é formada pelo arranjo de aminoácidos distantes entre si na cadeia polipeptídica e a estrutura quaternária pelo arranjo espacial de mais de uma cadeia de AAs, as subunidades da molécula.

A sequência específica de AAs na estrutura primária e o meio ambiente são o que determinam o processo de dobramento. O número de possíveis conformações de uma cadeia polipeptídica dobrada é cerca de 10^{80} (JAENICKE, 1991). A conformação tridimensional de uma proteína é um estado flutuante de um número

limitado de conformações preferenciais (TANG; DILL, 1998). A conformação mais estável de uma proteína é o seu estado nativo, que detém a sua atividade biológica.

Muitas forças estão envolvidas no dobramento de proteínas incluindo interações hidrofóbicas, que são interações repulsivas entre água e resíduos não polares em proteínas, levando a uma hidratação mínima na porção hidrofóbica, e interações intermoleculares ou forças de Van der Waals (íon-dipolo, dipolo-dipolo, dispersão e ligações de hidrogênio). A ligação de hidrogênio é a mais intensa de todas as forças intermoleculares. Dentre as forças envolvidas no dobramento das proteínas, a aparentemente predominante é a interação hidrofóbica.

A proteína na forma dobrada, adequada para exercer sua função biológica (configuração funcional, estado nativo), não é estável por tempo indeterminado. As proteínas podem sofrer um processo de desnaturação, devido a alterações químicas ou físicas da estrutura molecular, proporcionando mudanças conformacionais, que podem conduzir a uma perda da atividade biológica.

Assim, um dos maiores problemas para a utilização de proteínas como princípio ativo em produtos farmacêuticos é a sua instabilidade física e química.

A instabilidade física de proteínas envolve mudanças na estrutura secundária, terciária ou quaternária da molécula, por processos de desnaturação, agregação, precipitação e adsorção em superfície, que podem levar à perda ou redução da atividade biológica, redução da solubilidade e alteração da imunogenicidade (BURGESS, 1993).

A agregação é o mais importante evento para a instabilidade física. Evidências recentes sugerem que a agregação pode ocorrer por interação específica de certas conformações intermediárias de proteínas, e não por agregação não específica. As proteínas agregam-se para minimizar interações não favoráveis

termodinamicamente, entre solventes e resíduos hidrofóbicos de proteínas (WANG, 1999).

A interação hidrofóbica, a resistência de exposição de grupos polares à água, é considerada a maior força diretriz para agregação e dobramento de proteínas. A agregação e o dobramento de proteínas representam um balanço entre exposição e acobertamento de áreas superficiais hidrofóbicas. O balanço é tão delicado que a mudança de um aminoácido na proteína pode alterar substancialmente seu comportamento de agregação (FIELDS et al., 1992).

Vários fatores físicos, como temperatura, força iônica, agitação, adsorção à superfície/interface, exposição à luz, podem induzir a agregação de proteínas. O fator de crescimento do queratinócito humano recombinante, por exemplo, sofre leve desdobramento em temperatura elevada, levando a imediata agregação e precipitação (CHEN et al., 1994). A agregação protéica pode ser também devido à degradação ou modificação química com subsequente exposição de superfícies hidrofóbicas (ENGLAND, 1998). Proteínas podem formar diretamente agregados covalentes, como a insulina, a papaína e outras proteínas (KLIBANOV; SCHEFILITI, 2004; STRICKLEY, ANDERSON, 1997). Ligações dissulfeto contribuem para a formação de estruturas terciárias e a estabilização de estruturas secundárias (TAKANO et al., 1988). Troca de ligações dissulfeto é possível em ligações cisteína-cisteína, levando a agregação da macromolécula (Figura 4).

A formação de agregados covalentes pode ocorrer indiretamente, depois da oxidação de resíduos de histidina e metionina, como observado para relaxina humana (LI et al., 1995). Os agregados protéicos usualmente possuem atividade biológica reduzida ou são isentos de atividade (CONSTANTINO; LANGER; KLIBANOV, 1994; WEERT et al., 2002).

Figura 4 - Esquema da formação de agregados da Papaína.
(TURK,B.; TURK,V.; TURK,D., 1997)¹⁷.

As interações das proteínas com o SDS são muito estudadas na desnaturação de proteínas, principalmente no seu uso em eletroforese SDS-PAGE. A interação entre o SDS e a papaína é bem conhecida. O agregado formado pela papaína e o SDS resulta em cargas negativas na extensão da cadeia polipeptídica, causando a desnaturação da proteína. Existe a probabilidade de que, na região desnaturada, as porções hidrofóbicas da cadeia peptídica da enzima se liguem aos agregados de proteínas e SDS, formando pequenas micelas que estabilizam os grupos de agregação, e formam um invólucro em torno desses grupos. Esse modelo dos agregados de papaína e SDS é chamado de “colar de contas” (GHOSH, 2005).

Muitos fármacos protéicos são inativados por muitas reações químicas, cujo mecanismos incluem deaminação, racemização, hidrólise, oxidação, quebra e formação de ligações dissulfeto, isomerização, succinimidação, ligações cruzadas não dissulfeto, deglicosilação e por reação de Maillard (JAENICKE, 2000; LAI; TOPP, 1999). A grande variedade de grupos funcionais presentes nas proteínas

¹⁷TURK,B.; TURK,V.; TURK,D.. Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. **Biol. Chem.** v. 378, p. 141-150.1997.

amplificam o número de processos químicos que podem ocorrer (CONSTANTINO; LANGER; KLIBANOV, 1994). Fatores tais como pH, força iônica, composição de tampão, outros excipientes, luz, oxigênio atmosférico, íons metálicos e temperatura podem afetar o mecanismo de degradação (CLELAND; POWEL; SHIRE, 1994; FLORENCE; ATTWOOD, 2003).

A estrutura primária de uma proteína pode indicar como a molécula será degradada. A deaminação, degradação da cadeia lateral amida dos aminoácidos glutamina e asparagina, parece ser o processo de instabilidade química mais comum em proteínas farmacêuticas. A deaminação pode ser reduzida em pH abaixo da neutralidade. A estabilidade máxima de resíduos de asparagina em peptídeos e proteínas é encontrada entre pH 2-5, e, em pH 5-12, a reação ocorre rapidamente (WANG, 1999).

Cadeias laterais de triptofano, metionina e cisteína, e, em menor extensão, tirosina e histidina, são sítios potenciais de oxidação, e a oxidação é significativa em pH neutro e alcalino. Metionina, em particular, é propenso à oxidação por oxigênio atmosférico (MANNING; PATEL; BORCHARDT, 1989). A oxidação destes sítios pode ser catalisada por íons metálicos (processo sítio-específico) ou aumentado por oxidantes ou exposição à luz (processo sítio não-específico). Os sítios mais facilmente oxidáveis são os grupo tióis, presentes nos aminoácidos metionina e cisteína. A fácil oxidação de resíduos de metionina ocorre porque ela é um dos resíduos mais flexíveis em proteínas, sendo levemente polar ou não polar (RICHARDS, 1997).

O pH da formulação pode afetar a velocidade de oxidação por mudar o potencial de oxidação dos oxidantes, por alterar a afinidade da ligação entre íons

metais catalíticos e os aminoácidos ionizáveis, e por interferir na instabilidade de intermediários da oxidação.

O triptofano é um dos resíduos de aminoácidos em proteínas mais fotossensíveis, enquanto a ligação lisina-treonina indica a susceptibilidade à clivagem induzida pelo cobre. A hidrólise da ligação peptídica é possível nas ligações asparagina-prolina e asparagina-tirosina, sugerindo que estas seqüências são ácido-lábeis (INGLIS, 1983).

A estabilidade de proteínas é o resultado do balanço entre forças estabilizantes e desestabilizantes. Fatores como temperatura, pH da formulação, adsorção, sais, íons metálicos, agentes quelantes, agitação, agentes desnaturantes, solventes não aquosos, fonte e pureza de proteínas, morfismo protéico e alta pressão podem romper este delicado mecanismo.

O mais importante fator que afeta a estabilidade é a temperatura. Infelizmente, não há mecanismo geral para descrever o efeito da temperatura sobre a estrutura e função de proteínas, devido à sua complexa estrutura. Em geral, maior temperatura leva a menor estabilidade de proteínas. Quando a temperatura aumenta, interações eletrostáticas não são muito afetadas, ligações de hidrogênio tornam-se fracas e as interações hidrofóbicas são fortemente afetadas, até a temperatura de cerca de 110°C, quando a água não solvata grupos não polares em proteínas (JAENICKE, 1990). Temperatura também acelera degradação química, como o aumento da hidrólise de resíduos de asparagina, deaminação de resíduos de asparagina ou glutamina em RNase A e lisozimas (KINSELLA, 1991).

Proteínas são frequentemente estáveis em uma estreita faixa de pH, tais como pH 6,5-7,0 para fator recombinante VIII, pH 6,0-7,0 para uroquinase de baixa massa molecular (URKEJAN, 1994) e 7,0-8,0 para a papaína (MARTIN, 1957;

CALVERY, 1933). Em pHs extremos, longe do ponto isoelétrico (pI) de proteínas, aumentam repulsões eletrostáticas entre cargas iguais, resultando em uma tendência de desdobramento (DILL, 1990). O pH da formulação pode afetar a estabilidade física e química das proteínas. Diferentes degradações químicas podem ser facilitadas em diferentes pHs. Isso explica porque produtos de degradação são diferentes em diferentes pHs para a mesma proteína (GIETZ et al., 1998). Sob condições básicas, muitas reações podem ocorrer, tais como hidrólise de ligações peptídicas, deaminação, hidrólise de arginina a ornitina, β -eliminação, racemização e formação de dupla ligação.

Desenvolvimento de proteínas farmacêuticas tem mostrado ser desafiante pela complexidade de produção e purificação, e pela limitada estabilidade química e física delas. A instabilidade desse fármaco é uma das maiores razões pelas quais as proteínas são tradicionalmente administradas através de injeções e não por via oral, como os fármacos quimicamente menores (SANCHEZ-RUIZ; MAKATDZE, 2001; WANG, 1996).

A aplicação tópica de macromoléculas é indicada quando sua ação será superficial, como no caso da papaína, pois, devido ao seu tamanho molecular, não é possível a penetração através do estrato córneo.

A natureza hidrofílica e o grande tamanho molecular das proteínas *versus* o caráter lipofílico do estrato córneo são as maiores barreiras na aceitabilidade da epiderme como um sítio potencial de liberação e ação de proteínas farmacêuticas. A aplicação de produtos biofarmacêuticos à pele está restrita a uma ação bem superficial, como a ação de desbridamento da papaína sobre queimaduras e feridas.

Muitas macromoléculas possuem tempo de meia vida relativamente curto em meio aquoso, que pode conduzir a pobre biodisponibilidade e uma pobre

estabilidade do produto final. Para melhorar a biodisponibilidade e a estabilidade, as proteínas podem ser veiculadas em injeções oleosas, produtos de liberação sustentada, sistema de liberação particulado, implantes ou dispersões (emulsões e géis). Esses tipos de formas farmacêuticas possuem a vantagem de melhorar a estabilidade frente a uma formulação aquosa. Assim, a estabilidade de proteínas pode ser aumentada pela exclusão de água do produto ou pela adição de excipientes estabilizantes.

Para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos alguns componentes como sais, íons metálicos, poliólcoois, tensoativos, agentes redutores e agentes quelantes, outras proteínas, aminoácidos, ácidos graxos, polímeros e fosfolipídeos, podem melhorar a estabilidade de polipeptídeos e proteínas.

Tensoativos aniônicos e não iônicos são frequentemente adicionados para estabilizar macromoléculas, por prevenirem a adsorção de proteínas às superfícies, e porque reduzem a agregação induzida pela agitação e a precipitação (BAM; RANDOLPH; CLELAND, 1995). Alguns estudos têm investigado o efeito da concentração de tensoativos sobre a agregação de proteínas, sugerindo que a ação protetora coincide com a concentração micelar mínima para tensoativo. Estes dados suportam a teoria da formação de uma monocamada na interface água-ar, como sendo o mecanismo de ação (WANG; JOHNSTONE, 1993). Entretanto, altas concentrações de tensoativos podem desestabilizar a macromolécula (KATAKAM; BELL; BANGA, 1995).

A dificuldade de se obter fórmulas farmacêuticas e cosméticas estáveis contendo proteínas leva pesquisadores a buscarem a modificação da sua estrutura, a sua imobilização, o controle da ação, como o sistema desenvolvido por Weert et al. (2002), que utilizou um polímero de poli-orto-éster para encapsulação de proteína

semi-sólida. Esses tipos de estudos também têm sido realizados com a papaína e demonstram que, geralmente, há aumento da sua estabilidade, porém nem sempre a atividade é maior do que quando comparada à papaína livre em meio aquoso (KHAPARDE; SINGHAL, 2001; MIYAMOTO, 2004; SIM et al., 2000; VICENTE; AIRES-BARROS; EMPIS, 1994). Essas pesquisas são importantes para que se consiga o aumento da estabilidade da papaína em sistemas bifásicos, os mais utilizados em cosmetologia, já que há indícios de que a tensão interfacial nesses sistemas desestabiliza essa proteinase (FAN et al., 2001). Além disso, a associação com outros compostos como a uréia, estão sendo testados a fim de aumentar a estabilidade da papaína em formulações (EDWIN; SHARMA; JAGANNADHAM, 2002).

Estudos na modificação dos grupos de aminoácidos da enzima para uso em meio alcalino têm mostrado o aumento das propriedades catalíticas e na resistência à inativação térmica e autolítica (SANGEETHA; ABRAHAM, 2006). Já os solventes orgânicos diminuem a atividade da papaína (SZABELSKI; STACHOWIAK; WICZK, 2001).

As mudanças, físicas ou químicas, podem resultar em perda da atividade biológica, podendo ocorrer gradualmente durante o armazenamento da formulação, fato que tem limitado a vida de prateleira de produtos farmacêuticos contendo proteínas (BURGESS, 1993; SANCHEZ-RUIZ; MAKHATADZE, 2001).

Para desenvolver formulações estáveis contendo proteínas é necessário o maior conhecimento das interações delas com os vários componentes de uma formulação, e os efeitos na sua estabilidade (BAM; RANDOLPH; CHELAND, 1995). Assim, estudos de estabilidade em condições aceleradas estão sendo usados como

ferramentas para essa avaliação de formulações com proteínas (DI MAMBRO; BORIN; FONSECA, 2003).

Uma alternativa para as formulações de uso tópico contendo papaína é a forma farmacêutica gel, que é uma dispersão coloidal predominantemente hidrofílica (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2003), empregando polímeros inertes, química e fisicamente estáveis (EXCIPIENTES, 1998), o que pode minimizar as interações hidrofóbicas com a proteína.

Os géis possuem penetração pequena, pois não têm afinidade pelo sebo cutâneo, formando uma película após a evaporação da água, o que mantém os ativos sobre a pele (MOSQUEIRA, 1996). O uso de géis em produtos tópicos tem sido estabelecido no comércio de cosméticos e tratamento pessoal. O interesse no uso farmacêutico foi despertado pelo esforço em reduzir a exposição dos fármacos aos sistemas que os veiculam. Diversos antiinflamatórios não esteroidais estão sendo incorporados em géis para terapia tópica. Esses produtos, contendo carbômeros ou poloxâmeros como formadores de gel, têm demonstrado proporcionar adequados níveis dos fármacos no tecido onde foram aplicados (ZATZ; KUSHIA, 1996).

O Carbopol® 940, que é um polímero sintético derivado do ácido poliacrílico, forma géis de alta viscosidade e com boa aparência, mas sensíveis a variações do pH do meio. Esse polímero é utilizado como agente formador de gel em sistemas aquosos, agente regulador da viscosidade e estabilizador de emulsões. O Natrosol® HHR 250, polímero não iônico derivado da celulose, apresenta maior compatibilidade com o pH do meio e com a presença de eletrólitos, embora ocorra maior risco de contaminação microbiológica. O Natrosol® HHR 250 é utilizado

também como agente regulador da viscosidade, estabilizador de emulsão, espessante, formador de filmes e ligante (MERCK Index., 1996; TRAVERSA, 2003).

Os poloxâmeros são usados em formulações farmacêuticas como tensoativos, agentes emulsionantes, agentes solubilizadores, agentes dispersivos e promotores de absorção *in vivo*.

Os poloxâmeros são polímeros sintéticos formados por três blocos - poli(oxietileno)-poli(oxipropileno)-poli(oxietileno) (PEO – PPO – PEO). Todos os poloxâmeros possuem estruturas químicas semelhantes, diferenciando-se pela massa molecular e a composição do bloco de PEO hidrofílico (x) e do bloco PPO hidrofóbico (y) (Figura 5). Os dois poloxâmeros mais comumente utilizados são o poloxâmero 188 (x=80, y=27) com massa molecular variando entre 7680 a 9510 Da, e o poloxâmero 407 (x=101, y=56), que possui massa molecular variando entre 9840 a 14600 Daltons (ENGLAND, 1998; MAO et al., 2004).

Figura 5 – Estrutura química dos poloxâmeros. (PHARMTECH)¹⁸.

O poloxamer 407 (Pluronic F127® ou PF-127) é mais solúvel em água fria que em quente, o que se tem atribuído às extensas ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e os átomos de oxigênio do éter do polímero (FLORENCE; ATTWOOD, 2003). O decréscimo na solubilidade, com o aumento da temperatura, é

¹⁸ **PHARMTECH**, pesquisa realizada em 15/05/2006.
http://www.pharmtech.uni-erlangen.de/wahlpflichtfach/Mayer_06.pdf

devido à menor hidratação a altas temperaturas, causado pela quebra das ligações de hidrogênio. A baixa toxicidade dos poloxâmeros e sua capacidade de formar géis claros em meio aquoso torna-os úteis, particularmente em formulações de uso tópico (SAKASHITA et al., 1995). O PF-127 tem sido particularmente interessante pelo fato desse polímero ser uma solução, em baixas temperaturas, e forma gel, em temperaturas fisiológicas (37°C) (FANG et al., 2002; OH et al., 2005; ZATZ; KUSHIA, 1996). Em soluções aquosas, com o aumento da temperatura, os poloxâmeros se agregam em micelas para minimizar a energia livre da solução. Essa propriedade da reversão térmica do PF-127 é exibida em concentrações entre 20-35% (CABANA; AIT-KADI; JUHÁSZ, 1997; MORISHITA et al., 2001).

Uma importante característica do PF-127 é o aumento da estabilidade de proteínas veiculadas dentro da matriz do gel, prevenindo adsorção de proteínas em superfícies e também por sua habilidade em inibir a agregação, precipitação e desnaturação das proteínas (BAM; RANDOLPH; CLELAND, 1995; ENGLAND, 1998; MORISHITA et al., 2001; RAICHE; PULEO, 2003). O gel de PF-127 forma duas regiões anfifílicas distintas depois da hidratação. A partição dos fármacos entre esses dois segmentos da cadeia do polímero é conhecida por influenciar a difusão e a liberação dos fármacos a partir dos géis de PF-127. Tem sido relatado que a incorporação de aditivos hidrofílicos em formulações com gel de PF-127 acelera a liberação dos fármacos. Por outro lado, substâncias pouco hidrofílicas diminuem a taxa de liberação do fármaco a partir do gel (MORISHITA et al., 2001).

Hidrogéis preparados a partir de polímeros estão sendo empregados como veículos modernos no uso tópico de vários fármacos. Os géis de Carbopol® 940 e Pluronic® F-127 em formulações tópicas apresentam baixa reação de sensibilidade, isto é, reduzido aparecimento de eritema quando comparado a outros veículos de

fármacos para utilização na pele (FANG et al., 2002). Por comparação com outros poloxâmeros, o PF-127 é notavelmente menos tóxico quando administrado tanto por via intravenosa, quanto pela intramuscular (BOHORQUEZ et al., 1999; RAICHE; PULEO, 2003). Essas características são desejáveis para o uso em feridas e queimaduras, sendo o PF-127 uma alternativa atraente para o uso nesse tipo de lesão. Além disso, o fato de a formulação com o gel de PF-127 ser líquida a 5°C, favorece a aplicação do medicamento e a minimiza a dor do paciente, visto que não será necessário o contato das mãos para a administração do gel, podendo, perfeitamente, ser utilizado na forma de spray.

Devido ao uso difundido da papaína no Brasil, e aos poucos estudos sobre a estabilidade das formulações e matérias-primas comercializadas contendo essa enzima, tornam-se necessários o desenvolvimento de formulações estáveis e o estudo da estabilidade das mesmas.

2. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GERAL:

Esse trabalho teve por objetivo a caracterização física, físico-química e a avaliação da estabilidade da papaína matéria-prima de diferentes procedências, a preparação e a avaliação física, físico-química, da estabilidade da atividade proteolítica de formulações em gel contendo papaína e de sua eficácia para uso tópico “in vitro”.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Padronização e validação do método analítico para medida da atividade proteolítica da papaína e das formulações adicionadas da enzima;
- Análise eletroforética da papaína em gel de poliacrilamida, em condições não-dissociantes;
- Avaliação da estabilidade da atividade proteolítica da papaína comercializada para uso farmacêutico e cosmético armazenada em diferentes condições de temperatura e umidade;
- Desenvolvimento de formulações tópicas, do tipo gel, estáveis, para incorporar a papaína;

- Avaliação a estabilidade física dessas formulações e a estabilidade da atividade proteolítica frente a diferentes condições de temperatura e umidade;
- Avaliação da eficácia das formulações consideradas estáveis para uso tópico “in vitro”.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material:

3.1.1. Reagentes:

Foram utilizados reagentes de grau analítico em todas as análises realizadas. A papaína utilizada como padrão foi a da Sigma, extraída e purificada do látex do mamão verde *Carica papaya L.* (E.C. 3.4.22.2). Para o preparo das formulações foram utilizados reagentes de grau farmacêutico. As matérias-primas papaína foram adquiridas dos fabricantes A e B. O polímero Pluronic® F127 utilizado para o desenvolvimento de um dos géis e o Nipaguard®, foram gentilmente doados pela Zanini, Curtis & CIA LTDA e pela Special Farma, respectivamente.

3.1.2. Equipamentos:

- Agitador magnético MAG-MULTI, MARTE®
- Agitador de emulsões FISATOM® 713D
- Balança Analítica AG204 DeltaRange®, Mettler Toledo
- Balança eletrônica - Modelo AS 2000C - MARTE®
- Banho de água com temperatura controlada - Banho Maria 100, FANEM®
- Banho de água com temperatura controlada -180 series WATER BATH - PRECISION®
- Bomba a vácuo – Fabbe – Primar – mod. 141

- Centrífuga Excelsa® Baby I modelo 206-R, potência 440 Watts - Fanem®
- Destilador de água - Quimis® Q 341 - 210
- Espectrofotômetro CE-1021 - 1000 Series - CECIL®
- Fonte elétrica para eletroforese - modelo F.E. 1000
- Incubadora BOD MA 415 Marconi
- Liofilizador
- pH metro - DMPH-2 Digimed
- Sistema de eletroforese

3.2. Métodos:

3.2.1. Preparo das soluções-mãe das papaínas:

Soluções-mãe da papaína matéria-prima e padrão foram preparadas no momento do experimento, a fim de evitar a perda de atividade enzimática. Amostras de 50 mg da papaína, foram pesados e solubilizados em 50,0 mL de água destilada, em balão volumétrico. As soluções tiveram concentração final de 1 mg/mL.

3.2.2. Avaliação da atividade proteolítica da papaína:

A avaliação da atividade proteolítica da papaína matéria-prima, papaína padrão (Sigma) ou da papaína adicionada às formulações na forma de gel foi realizada usando a caseína como substrato. Soluções mãe das papaínas, matéria-prima e padrão, foram preparadas. Em tubos de ensaio de 10,0 mL foram adicionados volumes crescentes das soluções-mãe (0,1 mL a 0,8 mL). Em seguida, foram acrescentados 0,2 mL de uma solução ativadora, constituída por 0,05 M de cisteína, 0,02 M de EDTA, ajustada para pH 8,0 com NaOH 0,1 M. O volume de cada tubo foi completado para 1,0 mL com solução tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0. Em intervalos de 1 minuto entre cada tubo, 1,0 mL de solução de caseína 1% (p/v) foi adicionado. Após agitação, os tubos permaneceram em repouso por 10 minutos em banho de água a 37°C. Alíquotas de 3,0 mL de solução de ácido tricloracético 10% (p/v) foram adicionadas aos tubos, que permaneceram em repouso por 15 minutos, à temperatura ambiente, para interromper a reação enzimática e precipitar a

proteína íntegra. Em seguida, todos os tubos foram centrifugados a uma rotação de 3000 rpm (1660g) por 10 minutos, em centrífuga Excelsa Baby I modelo 206-R, potência 440 Watts, Fanem. Assim, a fração sobrenadante resultante foi empregada para medida da atividade enzimática.

A concentração do produto de hidrólise da caseína pela papaína foi determinada pela medida da absorvância da fração sobrenadante a 280 nm, em espectrofotômetro CE-1021. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de papaína que aumenta em 0,01 unidade a absorvância da fração sobrenadante a 280 nm, por minuto de reação. Para esse cálculo, foi usada a tangente da primeira parte da curva de absorvância por minuto versus quantidade de proteína (ARNON, 1970), assim como demonstra a Figura 6.

Figura 6 - Variação da absorvância a 280 nm por minuto de reação em função da concentração de papaína no meio reacional (em microgramas/mL).

3.2.3. Validação do método de medida de atividade proteolítica:

O método de medida de atividade proteolítica foi validado quanto aos parâmetros: linearidade, precisão e exatidão intra e interensaio, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), empregando papaína padrão da Sigma.

3.2.3.1. Linearidade/Faixa:

Para a avaliação da linearidade do método uma solução mãe de papaína padrão (139,0 µg/mL) foi preparada em água destilada e, desta solução, foram retiradas alíquotas de volumes variados (0,04 a 0,8 mL) para medida de atividade proteolítica, como descrito no item 3.2.2.. Uma curva relacionando a absorvância por minuto versus os microgramas de papaína por mililitro de meio reacional foi construída. Desta curva, cinco diferentes concentrações de papaína (2,78; 5,56; 8,34; 11,12 e 13,9 µg/mL) foram escolhidas e submetidas à medida de atividade proteolítica em triplicata (k=5; número de réplicas=3). A relação entre a absorvância por minuto versus a concentração de papaína (µg/mL) foi expressa matematicamente como uma reta de regressão tipo $y = bx + a$, obtida pelo método de ajuste dos mínimos quadrados.

3.2.3.2. Precisão e exatidão intra e inter ensaio:

A precisão e a exatidão da medida da atividade proteolítica foram determinadas no mesmo dia, com um número de repetições igual a 10 (intra-ensaio) e em três dias alternados, com um número de repetições igual a cinco (inter ensaio). Para cada dia de experimento uma curva de calibração foi construída, como descrito no item 3.2.3.1., e três soluções de papaína padrão, nas concentrações de 8,34; 11,12 e 13,9 µg/mL, foram preparadas e as atividades proteolíticas determinadas de acordo como item 3.2.2..

A precisão intra e interensaio do método de medida de atividade proteolítica, para as três concentrações de papaína, foram calculadas matematicamente pela fórmula:

$$CV (\%) = \frac{S}{x} \times 100$$

Onde: CV = coeficiente de variância

S = desvio padrão das diferenças de absorvância (absorvância da amostra subtraída da absorvância do branco)

x = média aritmética das diferenças das absorvâncias

A exatidão intra e interensaio, para as três concentrações de papaína, foi expressa matematicamente como a porcentagem de recuperação (R).

$$R (\%) = \frac{X_m}{\mu} \times 100$$

Onde: x_m = valor médio da atividade proteolítica encontrado

μ = valor aceitável como real da atividade proteolítica

3.2.3.3. Limites de detecção e quantificação:

Os limites de detecção e quantificação foram determinados experimentalmente, por meio da medida de atividade proteolítica das amostras de papaína de concentrações conhecidas e decrescentes, seguido pelas análises dos parâmetros de precisão e exatidão, para o limite de quantificação. O limite de detecção foi definido como a menor concentração de papaína cuja diferença entre as absorvâncias da amostra e do branco foi de aproximadamente 0,06, após a reação proteolítica.

3.2.4. Caracterização química, física e da atividade proteolítica das matérias-primas papaína:

Duas matérias-primas papaína, procedentes dos fabricantes A e B, foram adquiridas no comércio e analisadas quanto aos teores de proteína, quanto à quantidade de atividade proteolítica e quanto ao número de componentes protéicos e suas respectivas massas moleculares, por eletroforese em gel de poliacrilamida.

3.2.4.1. Determinação da quantidade de proteína pelo método de Lowry:

O teor de proteína foi determinado pelo método descrito por LOWRY et al. (1951), utilizando a proteína soro albumina bovina como padrão e, para a leitura da absorvância das amostras, o comprimento de onda utilizado foi o de 660 nm.

3.2.4.2. Avaliação da atividade proteolítica das matérias-primas papaína:

Para a avaliação da atividade proteolítica, soluções-mãe foram preparadas pela dissolução de amostras das matérias-primas, contendo o equivalente a 0,1 mg de proteína, em 1,0 mL de água destilada (item 3.2.1.). Em tubos de ensaio de 10,0 mL, foram adicionadas quantidades crescentes das soluções-mãe (0,1 a 0,8 mL) e 0,2 mL da solução ativadora (constituída por 0,05 M de Cisteína, 0,02 M de EDTA e o pH foi ajustado para 8,0 com NaOH). O volume de cada tubo foi completado para 1,0 mL com solução tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0. Em intervalos de 1 minuto

entre cada tubo, 1,0 mL de solução de caseína 1% (p/v) foi adicionado. Após agitação, os tubos permaneceram em repouso por 10 minutos em banho-maria, a 37°C. A atividade proteolítica foi determinada como discutido no item 3.2.2..

3.2.4.3. Análise eletroforética em condições dissociantes das matérias-primas papaína:

3.2.4.3.1. Procedimento eletroforético:

A placa de gel de poliacrilamida foi preparada de acordo com HEUSSEN e DOWDLE (1980) e as modificações feitas por MICHAUD, FAYE e YELLE (1993) para a papaína. A placa foi montada com gel de concentração (3% - pH 6,8) e gel de separação contendo acrilamida 15% (pH 8,8), de acordo com o Quadro 1.

COMPONENTES	GEL DE SEPARAÇÃO 15%	GEL DE CONCENTRAÇÃO 3%
Acrilamida (30%) / Bis-acrilamida (1%)	1650 µL	200 µL
Tris/HCl – 0,5 M/pH 6,8 contendo SDS 0,4%	-----	250 µL
Tris/HCl – 1,5 M/pH 8,8 contendo SDS 0,4%	1125 µL	-----
Persulfato de Amônio 10%	10 µL	20 µL
TEMED	5 µL	10 µL
Água destilada	1710 µL	1520 µL

Quadro 1 - Componentes dos géis de concentração e separação para a eletroforese em condições dissociantes.

Na preparação das amostras para eletroforese, a solução-mãe da papaína do fabricante A foi dialisada contra água deionizada, e, em seguida, essa solução foi liofilizada.

Soluções contendo 4 mg de MP/mL das matérias-primas foram preparadas com as amostras de papaína do fabricante A liofilizada, papaína do fabricante B e papaína padrão. Essas soluções foram diluídas na proporção de 1:1 (v/v) em sistema diluente, constituído de tampão Tris/HCl 62,5 mM, pH 6,8, 2% de SDS e 20% de glicerol. Alíquotas de 15 µL das soluções diluídas foram aplicadas à placa de gel de poliacrilamida. Como indicador da migração das amostras pelo gel, foi empregada a solução aquosa do corante azul de bromofenol a 0,003% diluída 1:1 no sistema diluente.

Nas cubas, superior e inferior, foi utilizado tampão Tris/Glicina (0,025 M/ 0,192 M, respectivamente), pH 8,5, contendo 0,1 % de SDS (LAEMMLI, 1970). A eletroforese foi desenvolvida a uma corrente constante de 8 mA, a 4°C, até o corante migrar totalmente pelo gel de separação.

3.2.4.3.1. a. Coloração do gel de poliacrilamida para detecção de proteínas:

O gel foi corado com solução 0,1% de Coomassie Brilliant Blue R350, obtida pela solubilização do corante em solução de isopropanol (25%) e ácido acético (10%). O gel foi mantido nessa solução por aproximadamente 2 horas e, então, o excesso do corante foi removido com solução de ácido acético 20%, durante 30 minutos e sob agitação constante. Em seguida, o gel foi lavado rapidamente com solução de ácido acético 7%, para permitir maior nitidez das bandas de proteínas.

3.2.4.3.2. Determinação das massas moleculares relativas das bandas protéicas:

Padrões de proteína com massas moleculares conhecidas [α -lactoalbumina (14,2 kDa), gliceraldeído 3-fosfato (36,0 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa) e a soro albumina bovina (66,0 kDa)], foram submetidos à eletroforese. Após a corrida das amostras pelo gel, o Rf de cada banda protéica foi determinado e relacionado ao logaritmo (log) da massa molecular relativa, para a construção de uma curva de calibração (Rf da banda protéica versus log da massa molecular). A curva de calibração foi utilizada para determinação das massas moleculares relativas das bandas protéicas separadas durante a análise eletroforética das amostras de papaína (matérias-primas e padrão).

3.2.5. Estudo da estabilidade da atividade proteolítica da matéria-prima papaína frente a diferentes condições de temperatura e umidade:

A estabilidade da atividade proteolítica da papaína, enquanto matéria-prima, foi avaliada pelo método discutido na seção 3.2.1., submetida, anteriormente, a diferentes condições de temperatura e umidade relativa (UR) durante o período de estocagem (4°C , 30°C – 70% UR e 40°C – 70% UR).

3.2.6. Preparação de formulações tópicas do tipo gel contendo papaína:

Diferentes formulações tópicas, forma farmacêutica do tipo gel, foram desenvolvidas no Laboratório de Controle de Qualidade. A enzima papaína foi adicionada às formulações, a uma concentração de 1%.

3.2.6.1. Formulação – gel de Pluronic® F127:

Componentes	Formulação base (g %)	Formulação adicionada da enzima (g %)
Água destilada	qsp 100,00	qsp 100,00
Pluronic® F127	20,00	20,00
Nipaguard®	0,80	0,80
EDTA	0,04	0,04
Cloridrato de Cisteína	0,16	0,16
Solução de NaOH 10 % (p/v)	qsp pH 6,5	qsp pH 6,5
Papaína	---	1,00

Quadro 2 - Componentes utilizados no preparo das formulações de Pluronic® F127 contendo papaína.

O gel de Pluronic® F127 foi preparado pelo método a frio descrito por Cabana et al. (1997). No preparo da formulação gel de Pluronic® F127 20% (p/p) pesou-se exatamente 20 g do polímero, 0,80g do conservante e 59,20g de água destilada previamente resfriada em geladeira. Um béquer contendo essa quantidade de água e do conservante foi colocado em banho de gelo e a temperatura foi mantida em torno de 5°C. Sob agitação constante, com auxílio de um agitador, o polímero foi adicionado lentamente. O polímero sofre hidratação e dispersa na água fria, sob agitação constante, e, para isso, a solução ficou agitando por um período de 2

horas. Nesse processo pode ocorrer formação de espuma. Após as duas horas, a solução teve o pH acertado para 8,0. Pesou-se, então, o cloridrato de cisteína e o EDTA, que foram dissolvidos em 10,0 gramas de água destilada. Em seguida, essa solução foi adicionada à solução do Pluronic® F127, sem que a agitação do mesmo fosse interrompida. Ainda sob agitação constante, a Papaína foi adicionada lentamente, previamente dissolvida em 10 gramas de água destilada. O gel permaneceu em banho de gelo e sob agitação constante por mais quatro horas. O pH foi conferido no final do processo, obtendo-se pH em torno de 6,5. Após as seis horas, a formulação permaneceu em repouso por 12 horas, em refrigerador ($5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Uma solução verdadeira é formada no período de seis a doze horas.

As formulações, com e sem papaína, foram acondicionadas em potes plásticos (polietileno de alta densidade) brancos de fundo falso, boca larga e tampa, preenchendo todo o volume do pote.

3.2.6.2. Formulação – gel de Carbopol® 940:

Componentes	Formulação base (g %)	Formulação adicionada da enzima (g %)
Água destilada	qsp 100,00	qsp 100,00
Carbopol® 940	0,60	0,60
Nipaguard®	0,80	0,80
Solução de EDTA 1% (p/v)	4,00	4,00
Propilenoglicol	5,00	5,00
Solução de NaOH 10 % (p/v)	qsp pH 6,5	qsp pH 6,5
Cloridrato de Cisteína	0,16	0,16
Papaína	---	1,00

Quadro 3 - Componentes utilizados no preparo das formulações de Carbopol 940®.

No preparo da formulação gel de Carbopol® 940 foram adicionados em um béquer contendo 20 g de água destilada o propilenoglicol, a solução de EDTA 1% (p/v) e o Nipaguard®. O Carbopol® 940 foi disperso nessa solução, que permaneceu em repouso por 24 horas, para total dispersão do pó de Carbopol® 940 na solução. Após essas 24 horas, o gel formado foi agitado com uma espátula até completa homogeneização. O pH foi acertado para 6,5 com a solução de NaOH 10%. Em um béquer à parte, 10 g de água destilada foram utilizados para solubilizar 160 mg de cloridrato de cisteína. Essa solução foi adicionada ao gel sob agitação constante. Em outro béquer, 20 g de água destilada foram utilizados para solubilizar a papaína. Aos poucos e sob agitação manual constante, essa solução foi adicionada ao gel. O restante da água destilada (38 g) foi adicionado lentamente e sob agitação constante, de modo que mantivesse a estabilidade do gel.

As formulações foram acondicionadas em potes plásticos (polietileno de alta densidade) brancos de fundo falso, boca larga e tampa, preenchendo todo o volume do pote.

3.2.6.3. Formulação – gel de Natrosol® 250 HHR:

Componentes	Formulação base (g %)	Formulação adicionada da enzima (g %)
Água destilada	qsp 100,00	qsp 100,00
Natrosol® 250 HHR	1,50	1,50
Nipaguard®	0,80	0,80
Solução de EDTA 1% (p/v)	4,00	4,00
Propilenoglicol	5,00	5,00
Solução de NaOH 10 % (p/v)	qsp pH 6,5	qsp pH 6,5
Cloridrato de Cisteína	0,16	0,16
Papaína	---	1,00

Quadro 4 - Componentes utilizados no preparo das formulações com Natrosol® 250 HHR.

Na preparação da formulação gel de Natrosol® 250 HHR, os componentes propilenoglicol, solução de EDTA 1% (p/v) e o Natrosol® 250 HHR foram adicionados em um béquer de vidro. Dezenove gramas de água destilada foram aquecidos a 50°C e acrescentados à mistura anterior, sob agitação constante. Após resfriamento do gel, foram adicionados 0,80g de Nipaguard®, homogeneizando com auxílio de espátula plástica. O pH foi acertado para 6,5 com a solução de NaOH 10%. O gel foi reservado. Dez gramas da água destilada foram utilizados para solubilizar a cisteína, em um béquer de vidro à parte. Essa solução foi acrescentada ao gel, homogeneizando constante e rapidamente, a fim de não desestabilizar a dispersão. Em outro béquer, 20 g de água destilada foram utilizados para dissolver a papaína. Aos poucos e sob agitação manual constante, essa solução foi adicionada ao gel. Os outros 19 g de água destilada foram adicionados lentamente e sob agitação constante ao gel.

As formulações foram acondicionadas em potes plásticos (polietileno de alta densidade) brancos de fundo falso, boca larga e tampa, preenchendo todo o volume do pote.

3.2.7. Avaliação prévia da estabilidade física, físico-química e da atividade proteolítica das formulações:

As formulações, após 48 horas de sua preparação, tempo necessário para estabilização do sistema, foram avaliadas quanto à sua estabilidade por características física, físico-química e da atividade proteolítica.

3.2.7.1. Avaliação visual:

As formulações preparadas, adicionadas ou não de papaína, foram observadas visualmente, a fim de detectar alterações de cor e homogeneidade (MAIA CAMPOS; BRADA, 1992).

3.2.7.2. Determinação do pH:

As formulações preparadas tiveram o pH determinado para verificar a compatibilidades dessas com o pH da pele e com o pH ótimo para a atividade proteolítica da papaína. Amostras das formulações foram diluídas a 10% em água deionizada, para que fosse determinado o pH de cada uma (MAIA CAMPOS; BRADA, 1992). Foi utilizado o pHmetro DMPH-2 Digimed e as amostras foram preparadas em triplicatas.

3.2.8. Avaliação da atividade proteolítica das formulações estáveis:

As formulações preparadas que apresentaram pH compatível com o pH da pele e pH ótimo para atividade proteolítica da papaína e homogeneidade visual foram analisadas quanto às suas atividades proteolíticas, de acordo com a metodologia descrita na seção 3.2.2..

Para a análise da atividade proteolítica das formulações estáveis, adicionadas ou não de papaína, alíquotas de 1,0 grama das formulações foram pesadas e

homogeneizadas em quantidade suficiente para 25,0 gramas de água destilada. As suspensões foram centrifugadas por 30 minutos. Alíquotas das frações sobrenadantes obtidas foram retiradas e a atividade proteolítica determinada de acordo com o método descrito no item 3.2.2., empregando como branco a fração sobrenadante da formulação base. A porcentagem de atividade proteolítica recuperada na fração sobrenadante foi determinada considerando como 100% a quantidade de unidades de atividade proteolítica teóricas contidas em 1,0 grama de formulação.

3.2.9. Uniformidade de conteúdo de atividade proteolítica nas formulações:

Para a avaliação da uniformidade de conteúdo de atividade proteolítica nas formulações, dez alíquotas de 1,0 grama de cada uma das formulações, adicionadas ou não de papaína, foram pesadas, preparadas, e a atividade enzimática medida de acordo com o procedimento descrito no item 3.2.7..

3.2.10. Estudos de estabilidade física, físico-química e da atividade proteolítica:

As formulações que apresentaram, nas condições experimentais testadas, atividade proteolítica da papaína foram submetidas a diferentes condições de estocagem: a 4°C, 30°C e 70% UR, e 40°C e 70% UR. Em tempos determinados,

amostras das formulações estáveis foram analisadas quanto à sua estabilidade física, físico-química e da atividade proteolítica.

3.2.10.1. Estabilidade físico-química das formulações estocadas:

Alíquotas das formulações estocadas foram avaliadas quanto à sua estabilidade por avaliação visual e por determinação do pH.

3.2.10.2. Estabilidade da atividade proteolítica da papaína incorporada às formulações:

Alíquotas das formulações estocadas sob as diferentes condições de temperatura e umidade relativa foram preparadas e analisadas quanto à sua atividade proteolítica de acordo com a seção 3.2.8., padronizada para análise das formulações.

3.2.10.3. Avaliação da eficácia da papaína para uso tópico *in vitro*:

A eficácia da papaína para o uso tópico foi avaliada *in vitro*, utilizando-se a gelatina como substrato. Foram preparados géis contendo gelatina conforme o Quadro 5, com dimensões de 6,0 x 6,5 cm, que foram colocados em diferentes placas de Petri. Sobre cada gel, foi adicionada uma alíquota das amostras a serem

testadas, de forma que se obtivesse uma circunferência de aproximadamente 2 cm de diâmetro (Figura 7). Foi avaliada a eficácia do pó de papaína, formulação extemporânea (solução aquosa de papaína 1%), formulação gel de Pluronic® F127 e formulação gel de Carbopol® 940 contendo a enzima a 1%. As placas foram colocadas em banho de água a 37°C por 6 horas. Após esse tempo, o excesso de formulação sobre os géis foi retirado com algodão umedecido com água, para que se procedesse com a coloração dos mesmos. A coloração do gel foi feita de acordo com o item 3.2.4.3.1.a., a fim de avaliar a ação proteolítica da papaína frente ao substrato. O excesso de corante foi retirado com solução de ácido acético 7%.

Quadro 5 - Componentes do gel para os estudos de eficácia *in vitro*.

COMPONENTES	Quantidade em μL
Acrilamida (30%) /Bis-acrilamida (1%)	3300 μL
Gelatina 0,2%	4000 μL
Persulfato de Amônio 10%	20 μL
TEMED	10 μL
Água destilada	3670 μL

Figura 7 – Esquema da montagem do gel para avaliação da eficácia *in vitro* da papaína para uso tópico.

4. RESULTADOS

4.1. Método de medida da atividade proteolítica da papaína padrão/ Validação do método:

4.1.1. Medida da atividade proteolítica/ Curva de Calibração:

A atividade proteolítica da papaína foi determinada pelo aumento da absorvância do meio reacional, em 280 nm, em função da hidrólise do substrato caseína. Foram realizadas medidas de atividade proteolítica empregando volumes de 0,04 a 0,8 mL de solução de papaína 139,0 µg/mL para a obtenção da curva representada na Figura 8a. Os resultados permitiram definir a linearidade do método analítico na faixa de 2,78 a 13,90 µg/mL de papaína. A curva de calibração foi construída plotando a absorvância a 280 nm por minuto versus quantidade de papaína (µg/mL). A representação gráfica de curva de calibração e o coeficiente de correlação linear foram determinados pela análise da regressão linear e estão apresentados na Figura 8b e Tabela 1, respectivamente. A curva de calibração apresentou boa linearidade e a equação representativa foi $y = 0,0038x + 0,0014$ (n=5, r= 0,9988).

Figura 8. a - Curva representativa do aumento da absorvância a 280 nm por minuto de reação em função da concentração de papaína ($\mu\text{g/mL}$) no meio reacional.

Figura 8. b – Relação linear entre aumento da absorvância em 280 nm em função da concentração de papaína ($\mu\text{g/mL}$) no meio reacional.

Tabela 1 - Resultados da análise de regressão linear dos dados da curva obtida pela relação entre o aumento da absorvância por minuto de reação (280 nm) em função da concentração de papaína ($\mu\text{g/mL}$) no meio reacional.

Parâmetros Estatísticos	
Equação da regressão ^(a)	$y = 0,0038x + 0,0014$
Coeficiente de regressão (r)	$r = 0,9988$
Erro padrão do slope	0
Erro padrão do intercepto	0,000178
Faixa de concentração ($\mu\text{g/mL}$)	2,78 – 13,90

^(a) Baseados em quatro curvas de calibração
 y = absorvância a 280 nm por minuto de reação

A atividade proteolítica da papaína, definida como a quantidade de enzima que aumenta em 0,01 a absorvância em 280 nm por minuto de reação, foi calculada da seguinte forma:

$$\begin{array}{rcl} & 0,02 \text{ Abs/min} & = 4,89 \text{ } \mu\text{g/mL} \\ \text{—} & 0,01 \text{ Abs/min} & = 2,26 \text{ } \mu\text{g/mL} \\ \hline & 0,01 \text{ Abs/min} & = 2,63 \text{ } \mu\text{g/mL} \end{array}$$

Então, 0,01 Abs/min = 1 unidade de atividade (U) = 2,63 $\mu\text{g/mL}$.

Portanto, 2,63 $\mu\text{g/mL}$ de papaína padrão Sigma têm 1 unidade de atividade enzimática.

4.1.2. Precisão e exatidão intra e interensaio:

Os resultados da precisão intra e interensaio para as três concentrações de papaína (8,34; 11,12 e 13,90 $\mu\text{g/mL}$) estão representados nas Tabelas 2, 3, 4 e 5. Os dados de recuperação intra e interensaio para as três concentrações de papaína estão mostrados na Tabela 6.

Tabela 2 - Determinação da repetibilidade do método de medida da atividade proteolítica da papaína, empregando a caseína como substrato (3 concentrações com 10 réplicas).

Nº de Análises	Amostra 1 (8,34 µg/mL)		Amostra 2 (11,12 µg/mL)		Amostra 3 (13,90 µg/mL)	
	Abs/min	Concentração Calculada	Abs/min	Concentração Calculada	Abs/min	Concentração Calculada
1	0,0339	8,55	0,0440	11,21	0,0543	13,92
2	0,0336	8,50	0,0437	11,13	0,0538	13,80
3	0,0338	8,50	0,0441	11,23	0,0544	13,95
4	0,0341	8,60	0,0444	11,31	0,0546	14,00
5	0,0336	8,50	0,0440	11,21	0,0543	13,92
6	0,0339	8,55	0,0438	11,58	0,0535	13,71
7	0,0338	8,50	0,0452	11,52	0,0540	13,84
8	0,0337	8,50	0,0439	11,18	0,0543	13,92
9	0,0339	8,55	0,0440	11,21	0,0544	13,95
10	0,0343	8,65	0,0442	11,26	0,0551	14,13
Média	0,0339	8,54	0,0441	11,28	0,0543	13,91
S^a	0,00022	0,0512	0,0004	0,1484	0,00044	0,1140
CV (%)^b	0,65	0,60	0,91	1,32	0,81	0,0082
EP (%)^c	0,00007	0,0162	0,00013	0,0469	0,00014	0,0361

^a Desvio Padrão

^b Coeficiente de Variação

^c Erro Padrão

Tabela 3 - Determinação da precisão interensaio do método de medida da atividade proteolítica da papaína, empregando a caseína como substrato, na concentração de 8,34 µg/mL de papaína, com 5 réplicas.

Nº de Análises	Dia 1	Dia 2	Dia 3
	Abs/min	Abs/min	Abs/min
1	0,0339	0,0342	0,0341
2	0,0340	0,0335	0,0346
3	0,0341	0,0355	0,0339
4	0,0343	0,0348	0,0344
5	0,0338	0,0333	0,0340
Média	0,0340	0,0343	0,0342
S^b	0,0002	0,0009	0,0003
CV (%)^c	0,56	2,62	0,85
EP (%)^d	0,0001	0,0004	0,0001

Precisão Intermediária (%) – 1,56

^a Concentração Calculada

^b Desvio Padrão

^c Coeficiente de Variação

^d Erro Padrão

Tabela 4 - Determinação da precisão interensaio do método de medida da atividade proteolítica da papaína, empregando a caseína como substrato, na concentração de 11,12 µg/mL de papaína, com 5 réplicas.

Nº de Análises	Dia 1	Dia 2	Dia 3
	Abs/min	Abs/min	Abs/min
1	0,0440	0,0448	0,0445
2	0,0437	0,0436	0,0449
3	0,0451	0,0440	0,0446
4	0,0444	0,0443	0,0443
5	0,0435	0,0441	0,0445
Média	0,0441	0,0442	0,0446
S^b	0,00063	0,00044	0,00022
CV (%)^c	1,43	0,99	0,49
EP (%)^d	0,0003	0,0002	0,0001
Precisão Intermediária (%) – 1,06			

^a Concentração Calculada

^b Desvio Padrão

^c Coeficiente de Variação

^d Erro Padrão

Tabela 5 - Determinação da precisão interensaio do método de medida da atividade proteolítica da papaína, empregando a caseína como substrato, na concentração de 13,90 µg/mL de papaína, com 5 réplicas.

Nº de Análises	Dia 1	Dia 2	Dia 3
	Abs/min	Abs/min	Abs/min
1	0,0532	0,0545	0,0543
2	0,0538	0,0552	0,0537
3	0,0544	0,0539	0,0545
4	0,0546	0,0542	0,0542
5	0,0543	0,0534	0,0537
Média	0,0541	0,0542	0,0541
S^b	0,0006	0,0007	0,0004
CV (%)^c	1,03	1,29	0,74
EP (%)^d	0,0003	0,0003	0,0002
Precisão Intermediária (%) – 0,92			

^a Concentração Calculada

^b Desvio Padrão

^c Coeficiente de Variação

^d Erro Padrão

Tabela 6 - Determinação da exatidão intraensaio (n=10) e interensaio (n=5) do método de medida da atividade proteolítica da papaína, empregando a caseína como substrato, para três concentrações de papaína.

	Exatidão intraensaio			Exatidão interensaio		
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentrações Teórica ($\mu\text{g/mL}$)	8,34	11,12	13,90	8,34	11,12	13,90
Concentrações Calculada ($\mu\text{g/mL}$)	8,54	11,24	13,92	8,62	11,28	13,87
Ativ. Proteolítica^a Teórica (U)	3,17	4,23	5,29	3,17	4,23	5,29
Ativ. Proteolítica^a Calculada (U)	3,25	4,27	5,29	3,28	4,29	5,27
Recup. Média (%)^b	102,46	101,08	100,01	103,4	101,45	99,74
S^c	0,68	1,00	0,83	1,68	1,12	0,94
CV (%)^d	0,66	0,99	0,83	1,62	1,10	0,94
ER%^e	2,52	0,95	0,00	3,47	1,42	0,38

^a Atividade Proteolítica

^b Recuperação Média

^c Desvio Padrão

^d Coeficiente de Variação

^e Erro Relativo

4.1.3. Determinação dos limites de detecção e quantificação:

O limite de quantificação foi determinado experimentalmente, através da preparação de uma série de amostras com quantidades decrescentes de papaína e cada uma foi analisada 5 vezes consecutivamente, como indicado por Eurachen (1993). O limite de quantificação encontrada para o método foi de 2,78 μg de papaína por mL de meio reacional, apresentando um coeficiente de variação de 6% para a precisão intra e interensaio e uma recuperação de 113% e de 115% para a exatidão intra e interensaio (Tabela 7).

O limite de detecção determinado para a medida de atividade proteolítica foi de 1,2 µg de papaína por mL de meio reacional. Esta concentração de papaína proporcionou uma medida de absorvância em 280 nm, que, descontada da absorvância do branco (meio reacional sem papaína), deu uma leitura de absorvância de 0,06, em 10 minutos de reação, que pode ser detectada com segurança pelo espectrofotômetro utilizado.

Tabela 7 – Valores de precisão e exatidão intra e interensaio calculados para o limite de quantificação determinado experimentalmente pelo método de medida da atividade proteolítica da papaína, utilizando a caseína como substrato.

Papaína (2,78 µg/mL)		
	Intraensaio (n=5)	Interensaio (n=15)
Concentração Calculada (µg/mL)	3,14	3,21
Recuperação (%)	113,0	115,5
S^a	6,53	7,0
CV (%)^b	6,0	6,0
ER (%)^c	12,9	15,0

^a Desvio Padrão

^b Coeficiente de Variação

^c Erro Relativo

4.2. Caracterização física, química e da atividade proteolítica da papaína nas matérias-primas:

As matérias-primas papaína dos fabricantes A e B foram caracterizadas quimicamente pela medida do teor de proteína (Tabela 8).

Tabela 8 – Medida da concentração de proteína total nas matérias-primas papaína comercializadas pelos fabricantes A e B.

Fabricantes	mg de proteína/ mg de MP	%
A	0,119	11,9
B	0,847	84,7

Para a medida da atividade proteolítica, quantidades diferentes das matérias-primas comercializadas pelos fabricantes A e B foram empregadas nos ensaios enzimáticos, de modo a obter-se, para ambas as matérias-primas, a mesma quantidade de proteína no meio reacional (Tabela 9 e Figura 9).

Tabela 9 – Medida do aumento da absorvância por minuto de reação em função da concentração de proteína ($\mu\text{g/mL}$), no meio reacional, para matérias-primas papaína dos fabricantes A e B.

Concentração de papaína ($\mu\text{g/mL}$)	A	B
	Absorvância a 280 nm/ minuto	Absorvância a 280 nm/ minuto
5	0,0206	0,0186
10	0,0347	0,0356
15	0,0469	0,0467
20	0,0595	0,0577
25	0,0701	0,0655
30	0,0755	0,0728
35	0,0806	0,0798
40	0,0845	0,0813

Figura 9- Representação gráfica do aumento da absorvância por minuto de reação em função da concentração de proteína para as matérias-primas papaína dos fabricantes A e B e das duas matérias-primas (C) .

As atividades proteolíticas da papaína dos fabricantes A e B determinadas em unidades de atividade por micrograma de proteína e por miligrama de matéria-prima estão demonstradas na Tabela 10.

Tabela 10 – Medidas de atividade proteolítica em unidades de atividade proteolítica (U) da papaína dos fabricantes A e B, por microgramas de proteína e miligramas de matéria-prima.

Fornecedores	Atividade específica da papaína	Unidade de Atividade(U)/mg de matéria-prima
SP Farma	0,4	48,80
Acros	0,4	336,00

4.3. Análise eletroforética em condições dissociantes da papaína padrão Sigma e das matérias-primas papaína dos fabricantes A e B:

O número de componentes protéicos presentes nas matérias-primas papaína dos fabricantes A e B , com suas respectivas massas moleculares relativas (MMr), foram determinados por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições dissociantes e comparados aos componentes protéicos da papaína padrão Sigma. Os resultados da análise eletroforética podem ser vistos na Figura 10.

A Figura 11 mostra a relação linear entre o logaritmo (log) das massas moleculares relativas dos padrões protéicos e as respectivas mobilidades eletroforéticas (Rf), como também a equação da reta e o coeficiente de regressão linear (R^2). As MMr calculadas para os componentes protéicos detectados pela análise eletroforética, presentes em ambas matérias-primas, estão apresentadas na Tabela 11.

Figura 10 – Análise eletroforética em placa de gel de poliacrilamida com SDS, da papaína padrão sigma (2), da papaína matéria-prima A (3), da papaína matéria-prima B (4) e da mistura de padrões protéicos de MMr (1).

Figura 11 – Relação linear entre o logaritmo das MMr dos padrões protéicos e as respectivas mobilidades eletroforéticas (Rf).

Tabela 11 – Massa molecular relativa (MM_r) obtida para os componentes protéicos detectados para as diferentes amostras de papaína.

Banda	Papaína Padrão		Papaína A Liofilizada		Papaína B	
	Rf	MM_r	Rf	MM_r	Rf	MM_r
1	0,16	66461,17	0,14	69682,22	0,14	69682,22
2	-	-	0,36	41402,63	0,36	41402,63
3	0,45	33460,70	0,42	35922,45	0,42	35922,45
4	-	-	0,45	33460,70	0,45	33460,70
5	-	-	0,73	17249,60	-	-
6	0,87	12385,14	0,87	12385,14	0,87	12385,14

4.4. Estudo da estabilidade da atividade proteolítica das matérias-primas papaína armazenada em diferentes condições de temperatura e umidade:

A avaliação da atividade proteolítica da papaína foi determinada usando caseína como substrato, segundo a metodologia descrita na seção 3.2.2..

A matéria-prima papaína A foi analisada visualmente quanto à alteração de coloração, durante o período de armazenamento, a 4°C, 30°C/70% UR e 40°C/70% UR. Os resultados mostram mudanças na coloração do pó no 15º dia, e essa mudança se intensificou até o 30º dia (Figura 12). O escurecimento da matéria-prima foi acompanhado por perda de atividade proteolítica. Resultados semelhantes foram observados para a matéria-prima papaína B.

A Figura 13 mostra o comportamento da atividade proteolítica das matérias-primas papaína após armazenamento a 4°C, 30°C/70% UR e 40°C/70% UR, por diferentes tempos. Observa-se que não houve perda de atividade proteolítica da papaína matéria-prima de ambos fabricantes, quando armazenadas a 4°C. Nas condições de armazenamento a 30°C/70%UR e a 40°C/70%UR, houve uma perda considerável da atividade (maior que 10%) já a partir do 15º dia de armazenamento, para a matéria-prima papaína A. A matéria-prima B mostrou-se pouco mais resistente à temperaturas elevadas, porém também houve perda significativa da atividade proteolítica da papaína nas condições extremas de estocagem (40°C/70%UR).

Figura 12 – Aspecto visual da matéria-prima papaína A armazenada a 40°C/ 70% UR, nos tempos zero, 15 e 30 dias de armazenamento.

As quantidades de atividade proteolítica, em unidades de atividade, das matérias-primas papaína dos fabricantes A e B, armazenados nas diferentes condições de temperatura e umidade, foram calculadas a partir dos gráficos mostrados na Figura 13. Os dados de quantidade de atividade proteolítica e a porcentagem de perda desta atividade nos diferentes tempos de armazenamento a 4°C, 30°C/70% UR e 40°C/70% UR, estão apresentados nas Tabelas 12 e 13.

Figura 13 – Medida do aumento de absorvância por minuto de reação em função da concentração da papaína A e papaína B no meio reacional ($\mu\text{g/mL}$), armazenadas a 4°C, 30°C/70%UR e 40°C/70%UR, nos tempos zero, 15 e 30 dias.

Tabela 12- Medida da atividade proteolítica em unidade de atividade (U) por miligrama da matéria-prima papaína A, armazenada a 4°C, 30°C/70%UR e 40°C/70%UR, em diferentes tempos.

Tempo de Armazenamento (Dias)	4°C		30°C/70% UR		40°C/70% UR	
	Atividade (U/mg)	Perda de Atividade (%)	Atividade (U/mg)	Perda de Atividade (%)	Atividade (U/mg)	Perda de Atividade (%)
0	48,80	---	48,80	---	48,80	---
15	48,80	0,00	27,11	44,45	30,50	37,5
30	48,80	0,00	20,35	58,40	18,77	61,54

Tabela 13- Medida da atividade proteolítica em unidade de atividade (U) por miligrama da matéria-prima papaína B, armazenada a 4°C, 30°C/70%UR e 40°C/70%UR, em diferentes tempos.

Tempo de Armazenamento (Dias)	4°C		30°C – 70% UR		40°C – 70% UR	
	Atividade (U/mg)	Perda de Atividade (%)	Atividade (U/mg)	Perda de Atividade (%)	Atividade (U/mg)	Perda de Atividade (%)
0	336,00	---	336,00	---	336,00	---
15	336,00	0,00	280,00	16,67	210,00	37,50
30	336,00	0,00	258,50	23,06	152,73	54,54

4.5. Preparo e avaliação física, físico-química, da atividade proteolítica das formulações contendo papaína e avaliação *in vitro* da eficácia da ação proteolítica da papaína nas formulações:

4.5.1. Avaliação física e físico-química das formulações:

Na avaliação prévia do aspecto visual das formulações, a formulação base manteve-se límpida e as três formulações adicionadas de papaína apresentaram-se opacas, levemente amareladas.

As formulações géis de Pluronic® F127, Carbopol® 940, e Natrosol® 250 HHR, que foram preparadas como descrito na metodologia (item 3.2.6.), contendo 1% da matéria-prima A (12 mg de proteína/g de formulação), tiveram seus pH determinados depois de 48 horas de preparo. Os resultados estão demonstrados na Tabela 14. Das três formulações, a formulação base de gel de Pluronic® F127 foi a que sofreu maior variação de pH com a adição de 1% de papaína.

Tabela 14 - pH das formulações preparadas com 1% de papaína A.

FORMULAÇÕES		pH
A	sem Papaína	7,08
	com Papaína	6,20
B	sem Papaína	6,38
	com Papaína	6,15
C	sem Papaína	6,60
	com Papaína	6,33

4.5.2. Avaliação da atividade proteolítica:

4.5.2.1. Interferência dos componentes das formulações na medida da absorvância em 280 nm:

Para verificar a influência dos componentes das formulações na medida da absorvância em 280 nm, dois controles foram empregados: tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8,0, e outro as formulações géis base homogeneizadas em água destilada, na proporção de 1 g de formulação para 25 g de água. O espectrofotômetro foi zerado com água destilada. Os resultados obtidos estão demonstrados na Figura 14.

Figura 14 - Interferência dos componentes das formulações na medida da absorvância em 280 nm.

4.5.2.2. Dosagem de atividade proteolítica das formulações:

A quantidade de atividade proteolítica da papaína nas formulações foi medida. Para isso, 1,0 grama de formulação foi homogeneizada em 25,0 gramas de água destilada, por 30 minutos e alíquotas da suspensão foram utilizadas para medida de atividade proteolítica, como descrito na metodologia no item 3.2.8.. As médias dos resultados obtidos encontram-se na Tabela 15, e a recuperação da atividade proteolítica em relação à atividade adicionada às formulações, está demonstrada na Tabela 16.

Tabela 15 - Quantidade de unidade de atividade proteolítica extraída de 1 grama das formulações.

Formulações Gel	Abs/min	Atividade proteolítica/mL de meio reacional (U/mL)*	Atividade proteolítica/grama de formulação (U/g)
Pluronic® F127	0,0259	3,00	380,0
Carbopol® 940	0,0290	3,44	430,0
Natrosol® 250 HHR	0,0004	0,24	30,0

* média de triplicatas

Tabela 16 - Recuperação da atividade proteolítica adicionada às formulações.

Formulações contendo 1 % de Papaína A	Atividade proteolítica adicionada/grama de formulação (U/g)	Atividade proteolítica recuperada/grama de formulação (U/g)	% de Recuperação
Pluronic® F127	4800,0	380,0	7,92
Carbopol® 940	4800,0	430,0	8,96
Natrosol® 250 HHR	4800,0	30,0	0,63

4.5.2.3. Avaliação da uniformidade de conteúdo de atividade proteolítica das formulações:

Para a avaliação da uniformidade de conteúdo de atividade proteolítica das formulações gel de Pluronic® F127 e de Carbopol® 940 dez amostras de 1,0 grama de cada formulação foram avaliadas quanto a quantidade de atividade proteolítica recuperada, como descrito em métodos, seção 3.2.8.. Os resultados estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 - Uniformidade do conteúdo de atividade proteolítica das formulações gel de Pluronic® F127 e de Carbopol® 940.

Amostras	Formulação gel de Pluronic® F127		Formulação gel de Carbopol® 940	
	Abs/min	U/g de formulação	Abs/min	U/g de formulação
1	0,0236	343,55	0,0286	424,19
2	0,0242	353,22	0,0283	419,35
3	0,0240	350,00	0,0275	406,45
4	0,0263	387,10	0,0303	451,61
5	0,0251	367,74	0,0286	424,19
6	0,0259	380,65	0,0307	458,06
7	0,0262	385,48	0,0309	461,29
8	0,0259	380,65	0,0318	475,81
9	0,0255	374,19	0,0299	445,16
10	0,0257	377,42	0,0301	448,39
Média	0,0252	370,00	0,0297	441,45
S^a	0,0010	15,70	0,0013	21,92
CV(%)^b	3,97	4,24	4,38	4,96

^a Desvio Padrão

^b Coeficiente de Variação

4.5.3. Estudo da estabilidade física, físico-química e da atividade proteolítica das formulações com e sem a matéria-prima papaína A:

Os testes preliminares da avaliação da atividade proteolítica da papaína mostraram baixa recuperação da atividade enzimática para as três formulações géis, principalmente para a formulação gel de Natrosol® 250 HHR. Apesar da baixa recuperação, os estudos de estabilidade foram realizados com as formulações géis de Pluronic® F127 e de Carbopol® 940.

As formulações géis de Pluronic® F127 e de Carbopol® 940, armazenadas a 4°C, 30°C/70% UR e 40°C/70% UR, foram avaliadas visualmente quanto à mudança de cor e presença de precipitado, e quanto a alteração do pH. Os resultados estão apresentados na Figura 15 e na Tabela 18.

A formulação gel de Pluronic® F127 mostra alteração de cor já no 15º dia de armazenamento a 40° C/70% UR, enquanto que nas demais condições de temperatura e umidade, não foi observada mudança de cor. No entanto, no 60º dia houve leve e intensa alteração da coloração do gel quando armazenado a 30°C/70% UR e 40°C/70% UR, respectivamente. Por outro lado, a formulação gel de Carbopol® 940 mostrou uma leve alteração de cor após 60 dias de armazenamento a 40°C/70% UR. Os resultados da avaliação da estabilidade das formulações, pela alteração de cor, indicam uma maior estabilidade da formulação gel de Carbopol® 940.

Os resultados de medida de valores de pH mostraram, apesar da variação da leitura observada, que na formulação gel de Pluronic® F127 armazenada a 40°C/70% UR foi observada uma queda constante dos valores de pH em função do tempo de armazenamento, acompanhando a alteração de cor.

Figura 15 – Avaliação visual das formulações géis de Pluronic® F127 (X) e Carbopol® 940 (Y) contendo 1% de papaína A, submetidas a diferentes condições de armazenamento, nos tempos zero, 15, 30 e 60 dias.

Tabela 18 – Determinação dos valores de pH das formulações géis de Pluronic® F127 (X) e Carbopol® 940 (Y) durante o período de armazenamento a 4°C, 30°C/70% UR e 40°C/70% UR.

Condições de Armazenamento	Período de Armazenamento	Formulação X pH		Formulação Y pH	
		Base	Com Papaína	Base	Com Papaína
4°C	48 horas (inicial)	7,02	6,20	6,38	6,15
	15 dias	7,05	6,17	6,33	6,10
	30 dias	7,03	6,10	6,34	6,12
	60 dias	7,01	6,16	6,35	6,07
30°C/70% UR	48 horas (inicial)	7,02	6,20	6,38	6,15
	15 dias	7,03	6,18	6,30	6,13
	30 dias	7,05	6,15	6,32	6,14
	60 dias	6,99	6,20	6,33	6,09
40°C/70% UR	48 horas (inicial)	7,02	6,20	6,38	6,15
	15 dias	7,02	6,15	6,32	6,10
	30 dias	7,08	6,13	6,35	6,08
	60 dias	7,03	6,10	6,30	6,12

As formulações adicionadas da papaína A foram submetidas à dosagem de atividade proteolítica em tempo inicial de preparo das formulações (48 horas), e depois do armazenamento a 4°C, 30°C/70% UR e 40°C/70% UR, em diferentes intervalos de tempo. Os resultados dos estudos de estabilidade da atividade proteolítica das formulações e da papaína matéria-prima (para comparação) estão apresentados na Figura 16.

Figura 16 – Medida da atividade proteolítica (U) da papaína na matéria-prima A (Z) e veiculada nas formulações géis de Pluronic® F127 (X) e de Carbopol® 940 (Y) em função do tempo, armazenados a 4°C, 30°C/70%UR e 40°C/70%UR.

4.5.4. Avaliação *in vitro* da eficácia da ação proteolítica da papaína em formulações tópicas:

A eficácia da ação proteolítica da papaína para o uso tópico foi avaliada *in vitro*, pela adição das formulações a um gel de poliacrilamida contendo gelatina como substrato. A eficácia proteolítica da papaína foi avaliada *in vitro* por meio da formação de uma área translúcida, após aplicação das formulações à superfície do gel de poliacrilamida contendo gelatina, seguido por um período de incubação e coloração com Coomassie Brilliant Blue R350. Além das formulações géis de Pluronic® F127 e de Carbopol® 940, foram testados o pó de papaína e a solução aquosa de papaína (solução extemporânea).

A formulação gel de Carbopol® 940 proporcionou o aparecimento de um halo mais nítido, devido a maior degradação da gelatina, indicando possuir uma melhor eficácia da ação proteolítica, seguido pela formulação gel de Pluronic® F127 (Figura 17).

Figura 17 – Avaliação *in vitro* da eficácia da ação proteolítica da papaína em formulações tópicas pela degradação da gelatina adicionada a gel de poliacrilamida. (P) Pó de papaína (Matéria-prima A); (S) Formulação Extemporânea (Solução de Papaína 1%); (X) Formulação Gel Pluronic® F127; (Y) Formulação Gel Carbopol® 940.

5. DISCUSSÃO

Papaína é uma enzima proteolítica ou uma mistura de enzimas proteolíticas, constituída, principalmente, de papaína e quimopapaína, preparada a partir do látex do mamão verde *Carica papaya* (Caricaceae). Essas enzimas hidrolisam ligações peptídicas, amidas e ésteres, especialmente em ligações envolvendo aminoácidos básicos, como a leucina ou a glicina (MARTINDALE, 2005). A principal aplicação da papaína na medicina é como agente de desbridamento de tecido necrosado, auxiliando e acelerando o processo de cicatrização.

No comércio, existem matérias-primas papaína de diferentes procedências, provenientes de diferentes processos de purificação. No desenvolvimento deste trabalho foi utilizada a matéria-prima papaína de dois fabricantes distintos: A e B. Essas matérias-primas foram caracterizadas quanto aos teores de proteína, por análise eletroforética e por medida de atividade proteolítica, usando a caseína como substrato.

Os resultados da dosagem de proteína mostraram que a papaína do fabricante A contém 0,12 miligramas de proteína por miligrama de matéria-prima, ou seja, 12% da composição da matéria-prima corresponde a proteína, que, provavelmente, está relacionado ao teor de papaína. A matéria-prima papaína do fabricante B contém, por sua vez, 84% de proteína (0,84 mg de proteína por miligrama de matéria-prima).

Os teores de proteína, 12% e 84%, indicam que ambas as matérias-primas são adicionadas de diluentes, como a lactose, que é citada na literatura como sendo o diluente encontrado na papaína (MERCK INDEX, 1996; TRAVERSA, 2003; USP

XXIX, 2006; VANDENPLAS et al.,1996). A proporção de diluente para proteína é maior, cerca de 5 vezes, na papaína A (88:12), do que na B (16:84).

Na caracterização eletroforética em condições dissociantes, os perfis eletroforéticos das matérias-primas A e B foram comparados ao perfil da papaína padrão (Sigma), com 99% de pureza. Durante a adequação do procedimento eletroforético, foi verificado que a quantidade de proteína da matéria-prima A não foi suficiente para a detecção nítida das bandas protéicas no gel de poliacrilamida com SDS.

Na tentativa de melhorar o perfil eletroforético da papaína do fabricante A, uma solução mãe mais concentrada dessa matéria-prima foi utilizada, visando a adição de maior quantidade de proteína à placa de eletroforese. No entanto, houve grande deformação das bandas protéicas, devido, provavelmente, à interferência do diluente presente. Assim, a solução-mãe dessa matéria-prima foi dialisada contra água deionizada, a fim eliminar o diluente presente, caso esse fosse de baixa massa molecular relativa. Após a diálise, a solução mãe foi liofilizada para a concentração do material. Em uma diálise, as partículas menores em solução são capazes de passar através da membrana, por manter um alto gradiente de concentração das moléculas difusíveis através da membrana e por se fazer trocas do líquido de tempos em tempos (KAYES, 1988; VOET, 1995). Com esse procedimento, foi possível aumentar cerca de seis vezes a concentração de proteína por miligrama de matéria-prima A. Esse resultado sugere que o diluente foi eliminado durante a diálise, podendo, assim, afirmar que o diluente possui baixa massa molecular relativa.

Os dados da análise eletroforética mostraram uma banda protéica larga e bem nítida (Banda 6 – Figura 10), com massa molecular de 12,4 kDa, detectada na

papaína padrão e em ambas matérias-primas. Para as três amostras de papaína, a mesma quantidade de proteína foi aplicada na placa de gel de poliacrilamida. As proteínas detectadas na Banda 6 (Figura 10), com massa molecular menor do que a papaína (23,4kDa), pode ser a papaína cistatina, o principal contaminante da papaína e quimopapaína (AZARKAN et al., 2003). O DNA que codifica a papaína cistatina foi seqüenciado por Zerhoumi et al (1998). A seqüência de aminoácidos revelou uma cadeia polipeptídica única com 98 aminoácidos e massa molecular relativa de 11131 Daltons (AZARKAN et al., 2003).

Nas matérias-primas A e B, além da banda 6, outras três bandas bem nítidas foram detectadas, com massas moleculares superiores àquela da banda 6 (Figura 10). Essas bandas podem ser enzimas proteolíticas, pois o látex do *Carica papaya* é constituído por uma mistura dessas enzimas. Kamnski e Bushuk (1968) detectaram quatro bandas de atividade proteolítica, quando a papaína purificada foi submetida à eletroforese em gel de amido. Por outro lado, essas bandas poderiam ser resultantes do desdobramento da estrutura molecular da papaína na presença de SDS. No entanto, com a amostra de papaína padrão, que foi tratada da mesma forma que as amostras de matéria-prima, estas bandas não foram detectadas, o que descarta essa possibilidade.

A atividade proteolítica das papaínas matérias-primas e padrão, assim como das formulações, foi determinada usando caseína como substrato, de acordo com o método descrito por Arnon (1970), que é uma modificação do método descrito na USP XXIX (2006).

O método de medida de atividade proteolítica foi validado de acordo com os parâmetros: linearidade, precisão e exatidão intra e interensaio, e limites de detecção e quantificação. A faixa de linearidade encontrada foi de 2,78 µg/mL a

13,90 µg de papaína por mL de meio reacional, e a equação de regressão linear igual a $y = 0,0038x + 0,0014$ ($r = 0,9988$). A precisão intra e interensaio permaneceram abaixo de 2%, sendo considerado preciso pelas normas do ICH (2001). O método mostrou ser exato nas concentrações de 8,34; 11,12 e 13,90 microgramas de papaína por mililitro de meio reacional, com uma recuperação média de 102,46%, 101,08% e 100,01% (intraensaio), e de 103,4%, 101,45% e 99,74% (interensaio), respectivamente.

Os limites de detecção e quantificação determinados foram de 1,2 µg/mL e de 2,78 µg/mL, respectivamente. O método analítico em seu limite de quantificação de 2,78 µg/mL apresentou uma precisão intra e interensaio com um coeficiente de variação inferior a 2%. Normalmente, para o limite de quantificação é fixado para precisão um coeficiente de variação de, no máximo, 10%, podendo ser aceito até 20%, em função das características do método analítico (EURACHEN, 1993). No entanto, a exatidão intra e interensaio do método de medida de atividade proteolítica, em seu limite de quantificação foi de 113% e 115%, respectivamente. A faixa de variação aceitável é de 98-107% para uma concentração do analito na amostra de 10% (AOAC, 1993), caso da matéria-prima papaína A, cuja concentração de proteína na matéria-prima é de 12%. A exatidão está fora da faixa aceitável devido, provavelmente, às características do método analítico.

Sankalia et al. (2005) validaram o método de medida de atividade proteolítica da papaína descrito na Farmacopéia Indiana, empregando um volume total de 5,0 mL de meio reacional, contendo 10 mg/mL de caseína, e o tempo de incubação foi de 60 minutos, a 40°C. Os autores encontraram a faixa de linearidade de 3 a 100 µg/mL, equação da regressão linear $y = 0,0042x + 0,0033$, os limites de detecção (0,77 µg/mL) e de quantificação (2,57 µg/mL). A faixa de linearidade encontrada

pelos autores difere daquela obtida em nossos experimentos (2,78 a 13,90 $\mu\text{g/mL}$). Os autores mencionaram que a papaína empregada é a purificada da Farmacopéia Indiana, mas não mencionaram o seu grau de pureza e nem o conteúdo de proteína.

Quando as matérias-primas papaína A e B foram analisadas quanto às suas atividades proteolíticas, a mesma quantidade de proteína foi adicionada ao meio reacional. Apesar da grande diferença do conteúdo de diluente observada para essas matérias-primas (88% na A e 16% na B), os perfis de atividade proteolítica de ambas as matérias-primas foram similares, como demonstra a Figura 9C, e muito semelhantes ao perfil da papaína padrão (99%).

A atividade proteolítica encontrada para as papaínas A e B foi de 0,4 U por micrograma de proteína (Tabela 10) e a encontrada para o padrão de 0,380 U por micrograma de proteína. No entanto, para que 0,4 U/mg de proteína fosse obtido para a papaína A, uma quantidade 7 vezes maior de matéria-prima foi utilizada em comparação à papaína B. Este resultado evidencia a importância da caracterização de matérias-primas macromoleculares pela medida das quantidades de atividade biológica e de proteína por grama de matéria-prima.

A papaína, ainda hoje, é utilizada nos hospitais em soluções aquosas extemporâneas, preparadas com o pó de papaína e água para injetáveis. A preparação da formulação no momento do uso exige pessoal treinado e qualificado, para que sejam evitados erros na concentração da solução, como também seja evitada a contaminação microbiana do produto. Além de demandar tempo para o preparo dessa formulação, soluções aquosas possuem baixa viscosidade, não se restringindo, quando aplicada, à área afetada pela lesão.

Devido a esses fatos, formulações géis de Natrosol® 250 HHR e Carbopol® 940, adicionadas de papaína a 3% ou em concentrações superiores, estão sendo

comercializadas para uso hospitalar, principalmente, para o tratamento de lesões de escaras. A escolha de formulação gel para veiculação de proteína se deve ao fato de que essas macromoléculas são, geralmente, incompatíveis com formulações contendo agentes emulsionantes, que podem proporcionar a deformação da estrutura molecular da proteína, levando à perda da atividade enzimática (BAM; RANDOLPH; CLELAND, 1995; FAN et al., 2001; SANCHEZ-RUIZ; MAKATDZE, 2001). Outra vantagem de se utilizar gel hidrofílico para veicular proteínas é a hidrossolubilidade dessas macromoléculas (MORISHITA et al., 2001).

Assim, três formulações géis adicionadas de 3% de matéria-prima papaína A foram preparadas: gel de Pluronic® F127, gel de Carbopol® 940 e gel de Natrosol® 250 HHR. No entanto, após um período de repouso, foi observada a formação de precipitado na formulação com o Pluronic® F127. Nas outras duas formulações, foi observada a diminuição da viscosidade, indicando instabilidade física, que poderia levar à perda de atividade enzimática mais acentuada. Dessa forma, as três formulações foram reformuladas com adição de 1% da matéria-prima papaína A.

A atividade proteolítica das formulações foi medida pelo mesmo método utilizado para a análise das matérias-primas. Entretanto, para a realização das determinações da atividade proteolítica das formulações foi verificado se os componentes dos géis também absorviam em 280 nm. Os resultados indicaram uma pequena interferência dos componentes, sendo essa interferência maior para a formulação com Natrosol® 250 HHR (absorvância/minuto do tampão no meio reacional foi igual a 0,0167 e da formulação base do gel de Natrosol® 250 HHR igual a 0,0182). A interferência observada não foi suficiente para invalidar o método da atividade proteolítica das formulações géis (Figura 15).

Os resultados da medida da atividade proteolítica da papaína adicionada às formulações géis de Pluronic® F127, gel de Carbopol® 940 e gel de Natrosol® 250 HHR mostraram baixa recuperação: 7,92%; 8,96%; e 0,63%, respectivamente (Tabela 16).

A baixa recuperação observada pode ser devido ao aprisionamento da molécula da enzima nas malhas do gel, que não se desfez totalmente durante a preparação da amostra, dificultando o acesso do substrato macromolecular.

Borin (2003) observou uma recuperação de 70% da atividade da superóxido dismutase (SOD), adicionada à formulação gel creme de Carbopol® 940. Esse maior nível de recuperação obtido pode ser devido à baixa massa molecular do substrato, o ânion superóxido, comparado ao substrato utilizado nesse estudo, a caseína. Esse fator pode ser determinante na recuperação, já que o ânion superóxido pode penetrar na malha do gel mais facilmente e reagir com a enzima, enquanto que a molécula de caseína, por ser bem maior, tem dificuldades de interagir com a papaína retida nas formulações.

A baixa recuperação pode ser devida, também, às interações químicas da enzima com os componentes das formulações, proporcionando perda total da atividade proteolítica, ou uma redução da velocidade da reação enzimática, de modo que o tempo de dez minutos de incubação não tenha sido suficiente para atuação da fração enzimática ligada. Di Mambro (2004) em formulações de gel de Natrosol® 250 HHR adicionada de SOD obteve baixa recuperação da enzima. Várias tentativas de extração da enzima, acompanhadas por medida do conteúdo de proteína e atividade enzimática, foram executadas. A autora não detectou proteína na fração extraída, indicando interação entre a SOD e os componentes da formulação gel de Natrosol® 250 HHR.

Finalmente, a baixa recuperação da atividade proteolítica das formulações preparadas pode ser devido ao próprio procedimento metodológico, uma vez que a caseína não hidrolisada é precipitada, por ação do ácido tricloracético. A precipitação da caseína associada com os agentes de consistência poderia arrastar os oligopeptídeos gerados durante a hidrólise do substrato, proporcionando menor medida de absorvância da fração sobrenadante, em 280 nm.

A baixa recuperação da papaína das formulações para o meio reacional não indica, necessariamente, perda da eficiência proteolítica das formulações *in vivo*. A medida da atividade proteolítica das formulações géis de Pluronic® F127 e Carbopol® 940 *in vitro* sugere que essas formulações apresentam uma fração do conteúdo de papaína livre que pode exercer prontamente o efeito proteolítico sobre o tecido necrosado. A outra fração de papaína, que pode ter interagido com os componentes das formulações, atuaria como um depósito da enzima, prolongando a ação enzimática, desde, é claro, que essa interação não tenha determinado perda da atividade proteolítica. Alguns trabalhos na literatura mostram que géis de Pluronic® F127 e Carbopol® 940 aumentam a estabilidade das proteínas, prevenindo a adsorção em superfícies e inibindo a agregação, precipitação e desnaturação dessas macromoléculas (BAM; RANDOLPH; CLELAND; 1995; ENGLAND, 1998; FANG et al., 2002; MORISHITA et al., 2001; RAICHE; PULEO, 2003). Além disso, o Pluronic® F127 tem sido utilizado para veicular proteínas em formulações de liberação controlada, diminuindo, assim, a velocidade de liberação delas a partir das formulações (MORISHITA et al., 2001; RAICHE e PULEO, 2003).

As formulações géis podem ter efeito proteolítico e de hidratação mais prolongados que as formulações extemporâneas. Quando a formulação extemporânea é utilizada, a troca de curativo ocorre, geralmente, a cada 12 horas,

proporcionando sofrimento do paciente, risco de contaminação e aumento de trabalho na enfermagem. Com o uso de formulações géis, a troca de curativo poderia ser a cada 24 horas.

As formulações géis de Pluronic® F127 e de Carbopol® 940 foram avaliadas quanto à uniformidade de conteúdo da papaína (Tabela 17). Os resultados indicaram homogeneidade de conteúdo do princípio ativo nas formulações e a reprodutibilidade da fração de papaína recuperada no meio reacional.

Na adequação do método foi avaliada a diferença da interferência na leitura a 280 nm da suspensão formada pela diluição de 1 grama de formulação em 25 gramas de água destilada e quando a mesma foi submetida a centrifugação, utilizando apenas o sobrenadante para prosseguir a reação. Os resultados mostraram que não há diferença significativa entre as leituras da suspensão e do sobrenadante na recuperação da atividade da enzima para as três formulações géis. Esses resultados favorecem a hipótese de que a porção relativa à atividade recuperada é aquela de papaína livre na suspensão da formulação em água. Quando foram realizados os mesmos testes com formulações contendo 3% de papaína, há um aumento significativo da atividade recuperada, porém não há diferença significativa entre centrifugar ou não a suspensão. Esse teste só pode ser realizado com as formulações de Carbopol® 940 e Natrosol® 250 HHR, devido à precipitação do ativo na formulação de Pluronic® F127, já citada anteriormente. A diferença entre as formulações contendo 1% e 3% de papaína, foi de 42 unidades de atividade por grama de formulação gel de Carbopol® 940, e de 26 unidades de atividade por grama de formulação gel de Natrosol® 250 HHR. O aumento da atividade recuperada era esperado diante dos indícios de que a porção livre de papaína seria a responsável por tal atividade, visto que, aumentando a quantidade

de enzima, o meio ficaria saturado, obtendo, assim, uma porção maior da proteína livre na suspensão.

Os parâmetros de temperatura e umidade relativa do ar para os estudos de estabilidade foram afixados como 4°C, 30°C/70% UR e 40°C/70% UR, já que o Brasil se encontra na Zona Climática IV (quente e úmida) (USP XXIX, 2006; SINGH, 1999a, 1999B). BRASIL (2005) recomenda que as câmaras climáticas devam ser requalificadas para umidade de 75% a partir da data de publicação da Resolução-RE nº 1 (29 de julho de 2005), ficando a critério dos pesquisadores reiniciar ou não estes estudos. Os estudos de estabilidade desse trabalho foram mantidos com a umidade relativa previamente determinada (70%).

A estabilidade da atividade proteolítica da papaína matéria-prima A e B, e da fração de papaína livre nas formulações géis Pluronic® F127 e Carbopol® 940, foi avaliada pelo método validado de medida de atividade proteolítica e que demonstrou ser adequado para os ensaios de estabilidade. As dosagens de atividade enzimática foram realizadas para as matérias-primas e formulações estocadas a 4°C, 30°C/70% UR e 40°C/70% UR. Os resultados para as matérias-primas estão demonstrados na Figura 14 e Tabelas 12 e 13. Os dados obtidos para as formulações encontram-se na Figura 17.

A perda de atividade proteolítica ocorreu mais acentuadamente nas temperaturas de 30°C/70% UR e 40°C/70% UR, tanto para as matérias-primas, quanto para as formulações. Os dados da Figura 17 sugerem que, a 30°C/70% UR, a enzima na forma de matéria-prima é menos estável que a papaína adicionada às formulações. Esses resultados diferem daqueles obtidos por Borin (2003) para a SOD, nos quais a matéria-prima apresentou-se mais estável que a enzima adicionada à formulação. Essa diferença pode ser devido ao fato de que a SOD

matéria-prima é estabilizada com polietilenoglicol. Comparando os resultados de estabilidade para a papaína matéria-prima e em formulações àqueles obtidos para a SOD, é notada a maior estabilidade da SOD, tanto em matéria-prima, quanto em formulações. Isso confirma, mais uma vez, a importância da estabilização de proteínas para veiculação em formulações.

Os estudos de estabilidade das formulações contendo papaína por avaliação visual acompanham os resultados de perda de atividade, pois há o escurecimento da formulação, que pode estar relacionado à deterioração da enzima com o tempo e o aumento da temperatura, provavelmente devido a uma oxidação dos grupos sulfidril da papaína (Figura 16). Isso se aplica também à matéria-prima pura, pois, após 30 dias estocada a 40°C, o pó escurece consideravelmente, e, após 60 dias, o pó se liquefaz, liberando um odor característico de enxofre, o que implica em destruição das ligações dissulfeto que a estabilizam enzima, como afirmaram Hwang e Yvy (1951). A Figura 12 mostra o escurecimento da matéria-prima papaína a 40°C, por um período de 30 dias.

Estudos estão sendo feitos para a estabilização da molécula de papaína de diversas maneiras, como a reação com polietilenoglicol, por imobilização, e até mesmo por obtenção de uma molécula mais estável utilizando a tecnologia do DNA recombinante (LEI et al., 2004; ZHUANG; BUTTERFIELD, 1992; WANG, 1999).

Os resultados dos estudos de estabilidade indicam que tanto a papaína matéria-prima, quanto as formulações adicionadas da enzima, foram estáveis por 6 meses, armazenados a 4°C, sendo o gel de Carbopol® 940 o que proporcionou maior estabilidade da enzima (Figura 16).

As diferentes formas como a papaína pode ser usada para o desbridamento de feridas de queimaduras, como o pó, solução aquosa e adicionada à formulações,

foram avaliadas quanto à eficácia da sua ação proteolítica *in vitro*, quando aplicadas topicamente.

O método desenvolvido em nosso laboratório teve como princípio a capacidade da papaína de hidrolisar proteínas. A proteína utilizada como substrato foi a gelatina. Um gel de poliacrilamida contendo a gelatina foi desenvolvido baseado em estudos de eletroforese, pois uma placa contendo apenas gel de gelatina não se manteve fisicamente estável, quando submetida às condições do ensaio (banho-maria a 37°C). O princípio da coloração de proteínas nos géis de eletroforese definiu a forma de avaliação da ação proteolítica da enzima sobre o gel, ou seja, nos locais onde a papaína agisse, não seriam corados pelo Coomassie Brilliant Blue, que é capaz de complexar com proteínas em quantidades de microgramas (VOET, 1995).

O tempo de duração do ensaio foi definido em testes preliminares, sendo avaliados os tempos de 6, 12 e 24 horas, que são os tempos médios de trocas de curativos em hospitais e unidades básicas de saúde. O tempo de 6 horas foi suficiente para a ação da papaína, que não aumentou significativamente em 24 horas. Além disso, o gel tende a ressecar-se a 37°C por mais de 6 horas, sendo uma limitação desse método de análise.

Os resultados mostraram que o método permite a avaliação da ação proteolítica da papaína pura e veiculada em diferentes formulações.

A figura 18 mostra que a formulação gel de Carbopol® 940 contendo papaína foi mais eficaz do que a formulação gel de Pluronic® F127, formulação extemporânea e o pó. Nos dois últimos casos, observou-se um maior ressecamento do gel, o que explica sua menor eficácia, já que a papaína necessita de água para degradar as proteínas (KIMMEL; SMITH, 1970; NIIMAK et al., 1993).

Os géis contendo papaína mostraram-se eficazes, porém os melhores resultados foram obtidos com o gel de Carbopol® 940. Esses resultados diferem daqueles obtidos para o método usando caseína como substrato, que indicaram que as atividades proteolíticas recuperadas das duas formulações são muito semelhantes. Provavelmente, essa diferença acontece porque na hidrólise da caseína, a reação ocorre em um tempo de 10 minutos, e na avaliação da eficácia da ação tópica, em 6 horas, sugerindo que ocorre, além da ação da papaína livre, uma maior liberação da enzima pelo gel de Carbopol® 940, do que foi liberado pelo gel de Pluronic® F127. A maior interação desse gel com a papaína pode ter ocorrido por ligações de hidrogênio entre a proteína e o polímero (FLORENCE; ATTWOOD, 2003), principalmente porque a concentração do Pluronic® F127 na formulação (20%) é muito maior do que a concentração do Carbopol® 940 na outra formulação (0,6%). Além disso, observa-se que esse gel limitou-se ao local de aplicação, enquanto que o gel de Pluronic® F127 não teve o mesmo comportamento, já que tem menor viscosidade que o primeiro.

As afirmações de que os polímeros dos géis interagem com a papaína e que parte da atividade proteolítica recuperada seja devido à quantidade de papaína livre nas formulações, são mais fundamentadas a partir do teste de eficácia proteolítica *in vitro*. Pode-se questionar, portanto, a utilização de formulações muito concentradas de papaína (3%, 4% e 8%), já que, para veicular a enzima nestas concentrações, não será possível utilizar o Carbopol® 940 a 0,6% e nem o Pluronic® F127, que perdem a estabilidade física, reduzindo a viscosidade do primeiro e formando precipitado na formulação gel de PF-127. Para isso, a formulação deveria ter a concentração de Carbopol® 940 aumentada, aumentando, assim, a probabilidade

de interação da proteína com o polímero, e, apesar de a papaína estar em maior concentração, não necessariamente a formulação será mais eficaz.

O gel de Carbopol® 940 demonstrou ser a forma farmacêutica mais adequada para a veiculação da papaína. Formulações gel desse polímero contendo diferentes concentrações de papaína são desenvolvidas e utilizadas no Hospital das Clínicas de São Paulo (HCSP), em todos os seus institutos, para o tratamento de escaras de decúbito, principalmente, feridas e queimaduras. BORI (2006), afirma que o consumo do gel de papaína aumentou significativamente em 2006 no HCSP e que, no serviço de farmacovigilância do Instituto do Coração (InCor) desse hospital, ainda não recebeu nenhuma notificação de reação adversa a esse medicamento. Esse relato indica que o uso de gel de Carbopol contendo papaína é eficaz e seguro.

Estudos de controle de qualidade e estabilidade microbiológica das formulações deverão ser realizados, a fim de avaliar a provável ação antibacteriana da papaína e, assim, determinar a necessidade de adicionar conservantes às formulações.

O desenvolvimento de formulações tópicas contendo papaína é importante para a qualidade da assistência ao paciente, seja no atendimento ambulatorial, seja no hospitalar. A avaliação da qualidade das matérias-primas contendo papaína é imprescindível para determinação da concentração da mesma nos produtos, a fim de desenvolver um medicamento eficaz e seguro. Sendo assim, fabricantes de produtos contendo essa enzima devem, também, qualificar seus fornecedores e, em contrapartida, deveria haver discussões com os órgãos de Vigilância Sanitária, e, principalmente, com a Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), acerca da necessidade de constar nos laudos de controle de qualidade das matérias-primas o teor de proteínas.

Além da melhoria da qualidade da assistência ao paciente, o desenvolvimento de formulações contendo papaína reduz os riscos ocupacionais que ocorrem, comprovadamente, com a exposição ao pó de papaína, seja na aplicação do mesmo, seja no preparo de pastas e soluções extemporâneas nas enfermarias, o que pode ser evitado em uma estrutura adequada de manipulação e produção de medicamentos, como as farmácias e indústrias (CHAMBERS et al., 1998; FLÓ et al., 2006; MAPP, 2001; NIINIMÄKI et al., 1993; QUIÑONES et al., 1999; SOTO-MERA et al., 2000; VANDENPLAS; VANDEZANDE, 1996). Adicionalmente, a formulação pronta facilitaria a prestação de serviços pela equipe de saúde, podendo ser acondicionada em embalagens de uso individual, como bisnagas, favorecendo a aplicação do produto e evitando erros de medicação, já que os riscos de erros na preparação do medicamento extemporâneo serão eliminados. A administração de uma formulação acondicionada em embalagem de uso único também favorece o paciente, evitando que a mesma seja contaminada. Outra vantagem da formulação em relação à solução extemporânea é que, na aplicação das mesmas, a formulação fica delimitada à área em que foi aplicada. O uso da embalagem do tipo bisnaga é a melhor opção, visto que não será necessário o uso de espátulas ou o contato da mão de quem for administrar o medicamento com a ferida, minimizando a dor do paciente e o risco de contaminação cruzada entre os pacientes.

Assim, a formulação gel de Carbopol® 940 contendo papaína, desenvolvida durante este trabalho, mostrou ter estabilidade física e funcional (atividade proteolítica), quando armazenada a 4°C, por um período de 6 meses. Além disso, foi a que apresentou maior eficácia proteolítica no teste *in vitro* de eficácia para uso tópico. Dessa forma, esta formulação poderá ser empregada para auxiliar no processo de cicatrização de feridas e queimaduras, nos diferentes níveis

assistenciais de saúde (unidades básicas de saúde, clínicas e hospitais), com garantia de eficácia, segurança, e qualidade de cada lote dos produtos, o que não pode ser garantido quando preparações extemporâneas são empregadas.

6. CONCLUSÕES

- 6.1. o método de dosagem que utiliza a caseína como substrato para a papaína pode ser utilizado para a quantificação da atividade proteolítica da enzima presente nas formulações, pois as interferências na dosagem da papaína que as formulações base causam não influenciaram nos resultados, após a metodologia sofrer as devidas adaptações;
- 6.2. o método de determinação da atividade proteolítica é robusto e pode ser facilmente empregado nos laboratórios de controle de qualidade de farmácias de manipulação e indústrias;
- 6.3. a condição mais adequada para a estocagem da matéria-prima papaína é sob refrigeração (4°C);
- 6.4. as formulações preparadas contendo papaína, não são fisicamente estáveis quando submetidas condições de armazenamento tais como temperaturas de 30°C e 40°C;
- 6.5. a condição mais adequada para a estocagem dos géis de Pluronic® F127 e Carbopol® 940 contendo papaína 1% (p/p) é sob refrigeração (4°C);
- 6.6. o tempo de armazenamento dos géis de Pluronic® F127 e Carbopol® 940 contendo papaína 1% (p/p) sob refrigeração (4°C) é de seis meses;
- 6.7. as formulações géis de Pluronic® F127 e Carbopol® 940 contendo papaína demonstraram ter eficácia (*in vitro*) para uso tópico;
- 6.8. a formulação de Carbopol® 940 é a mais adequada para veicular a papaína.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹⁹

- ARNON, R.. Papain. **Methods in Enzymology**. V. 19, P. 226-244. 1970.
- AYELLO, E.A.; CUDDIGAN, J.E.. Debridement: Controlling the necrotic/cellular burden. **Advances in skin & wound care**. V. 17, n. 2, p. 66-75. 2004.
- AZARKAN, M.; MOUSSAOUI, A.E.; WUYTSWINKEL, D.V.; DEHON, G.; LOOZE, Y.. Fractionation and purification of the enzymes stored in the latex of *Carica papaya*. **Journal of Chromatography B**. v. 790. p. 229-238. 2003.
- BALLS, A.K.; LINEWEAVER, H. Isolation and properties of crystalline papain. **J. Biol. Chem.** Baltimore, v.130, p. 669-686,1939.
- BALLS, A.K.; LINEWEAVER, H.; THOMPSON, R.R.. **Science**. v.86, p. 379,1937.
- BAM, N.B.; RANDOLPH, T.W.; CLELAND, J.L.. Stability of protein formulations: investigation of surfactant effects by a novel EPR Spectroscopic Technique. **Pharmaceutical Research**. V. 12, n. 1, p. 2-10. 1995.
- BERSIN, T. Biochem. Z.. v. 278, p. 340. 1935. Apud: KIMMEL, J.R.; SMITH, E.L.. The properties of papain. **Advan. Enzymol.**,v. 19, p. 267-334. 1957.
- BLANES, L. Tratamento de feridas. Baptista-Silva JCC, editor. **Cirurgia vascular: Guia ilustrado**. São Paulo: 2004. Disponível em: URL: <http://www.bapbaptista.com>
- BOCK,U.; KOLAC,C.; BORCHARD, G.; KOCH, K.; FUCHS, R.; STREICHHAN, P.; LEHR, C.M.. Transport f proteolytic enzymes across Caco-2 Cell Monolayers. **Pharmaceutical research**. v. 15; n. 9. 1998.
- BOHORQUEZ, M.; KOCH, C.; TRYGSTAD, T.; PANDIT, N.. A study of the temperature-dependent micellization of Pluronic F127. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 216. p. 34-40. 1999.
- BORIN, M.F.. **Controle de qualidade químico, físico e microbiológico da superóxido dismutase e de formulações de uso tópico contendo a enzima**. 159 p. .Tese para obtenção do grau de doutor. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2002.
- BROCKLEHURST, K.. Papain and related proteins. **Nature**. v. 345, p. 394. 1990.

¹⁹De acordo com a NBR 6023, preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), apresentada nas Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP. São Paulo, 2004.

BURGEEES, D.J. Drug delivery aspects of biotechnology products. In: PEZZUTO, I.M.; JOHNSO, M.E.; MANASSE, H.R.. **Biotechnology and pharmacy**. P. 16-151, 1993.

CABANA, A.; AÏT-KADI, A.; JUHÁSZ, J.. Study of the gelation process of Polyethylene Oxide_a – Polypropylene Oxide_b Copolymer (Poloxamer 407) aqueous solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 190. 307-312. 1997.

CALVERY, H.O. The hydrolysis of crystalline egg albumin by pepsin papain-hydrocyanic acid, and pancreatic proteinase and the subsequent enzymes. **J. Biol. Chem.** V. 102, p. 73. 1933.

CARVALHO, J.P.; SANTOS, A.S.; AS, A.S.; TEIXEIRA, C.S.; NOGUEIRA, M.S.. Estabilidade de medicamentos no âmbito da farmacovigilância. **Revista Fármacos & Medicamentos**. Racine. São Paulo, v. 34, n. VI. p. 22-27. 2005.

CHAMBERS, L.; BROWN, A.; PRITCHARD, D.I.; SREEDHARAN, S.; BROCKLEHURST, K.; KALSHEKER, N.A.. Enzymatically active papain preferentially induces na allergic response in mice. **Biochemical and Biphysical Research Communications**. V. 253, p. 837-840. 1998.

CHEN, B.L.; ARAKAWA, T.; HSU, E.; NARHI, L.D.; TRESSEL, T.J.; CHIEN, S.L.; Strategies to suppres aggregation of recombinant keratinoyte growth factor during liquid formulation development. **J. Pharm. Science**. V. 83, p. 1657-1661. 1994.

CLELAND. J.L., POWELL, M.F. SHIRE, S.J. The development os stable protein formulations: a close look at protein aggregation, deamination, and oxidation. **Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst**. v. 10, nº 4, p. 307-377. Review.

CONSTANTINO, H.R.; LANGER, R.; KLIBANOV, A.M.. Solid-Phase aggregation of proteins under pharmaceutically relevant conditions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 83, n. 12, p. 1662-1669. 1994.

DAGAR, V.K.. Factors affecting the stability of pharmaceutical products. **The Eastern Pharmacist**. june, p. 41-42. 1990.

DAVANÇO, A. Dentista sem dor. **Gazeta de Ribeirão**. Ribeirão Preto, 26 de setembro de 2004. Cidades. Saúde. p. 26. 2004.

DEF. **Dicionário de Especialidades Farmacêuticas**: DEF 2002/03. 31ª Edição. Rio de Janeiro. Produção JBM (Jornal Brasileiro de Medicina). Edição de Publicações Científicas. 2002. p. 502.

DILL, K.A.. Dominant forces in protein folding. **Biochemistry**. V. 29, p. 7133-7155. 1990.

DI MAMBRO, V.M.; BORIN, M.F.; FONSECA, M.J.V.. Topical formulations with superoxide dismutase: influence of formulation composition on physical stability and enzymatic activity. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 32, p. 97-105. 2003.

DUARTE, M.A.H.; YAMASHITA, J.C.; LANZA, P.; FRAGA, S.C.; KUGA, M.C.. Influência da irrigação endodôntica com gel de papaína no selamento apical. **Salusvita**. v. 20, n. 2, p. 27-33. 2001.

EDWIN, F.; SHARMA, Y.V.; JAGANNADHAM, M.V.. Stabilization of Molten Globule State of Papain by Urea. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. V. 290, p. 1441-1446. 2002.

ENGLAND, J.L.. Stabilization and release effects of Pluronic Polyols in protein drug delivery. **Research Science Institute**. August, 5. 1998.

EURACHEN GUIDANCE DOCUMENT. Nº WGD2. "Accreditation for chemical laboratories: Guidance on the interpretation of the EM 45 000 series of standards and ISO/IEC". Guide, 25. 1993.

EV, L.S.. Estabilidade de Medicamentos. In: GOMES, MJVM; REIS, AMM. **Ciências Farmacêuticas: Uma abordagem em Farmácia Hospitalar**. 1ª Edição. São Paulo; Editora Atheneu, 2001. p. 35-250.

EXCIPIENTES em destaque: Carbopols (Carbômeros). **International Journal of Pharmaceutical Compounding**. Edição Brasileira. V. 1, n. 1, p. 28-29. Nov./dez. 1998.

FAN, K.K.; OUYANG, P.; WU, X.; LU, Z.. A model of interfacial inactivation for papain in aqueous organic biphasic systems. **Enzyme and Microbial Technology**. v.28,p.3-7. 2001.

FANG, J.Y.; LEU, Y.L.; WANG, Y.Y.; TSAI, Y.H.. In vitro topical application and in vivo pharmacodynamic evaluation of nonivamide hydrogels using Wistar rat as the animal model. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 15. p. 417-423. 2002.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Resolução RDC nº 151, 17 de junho de 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. 2003.

FERREIRA, E.; LUCAS, R.; ROSSI, L.A.; ANDRADE, D.. Curativo do paciente queimado: uma revisão de literatura. **Revista da Escola de Enfermagem/USP**. V. 37, n. 1, p. 44-51. 2003

FERHST, A.. **Estructura y mecanismo de los enzimas**. Editorial Reverté. Espanha, 1980.

FIELDS, G.; ALONSO, D.; STIGER, D.; DILL, K.. Theory for the aggregation of proteins and copolymers. **J. Phys. Chem.** V. 96, p. 3974-3981. 1992.

FLINDT, M.. Health and safety aspects of working with enzymes. **Process. Biochem.** V. 13, n. 8, p. 3-7. 1978.

FLÓ, C.; LOPES, F.D.T.Q.S., KASAHARA, D.L., SILVA, A.C.D., JESUS, R.C.C.; RIVERO, D.H.R.F.; SALDIVA, M.A.M.; JACOB FILHO, W.. Effects of exercise training on papain-induced pulmonary emphysema in Wistar rats. **Journal of Applied Physiology.** V. 100, p. 281-285. 2006.

FLORENCE, A.T.; ATTWOOF, D.. **Princípios Físico-químicos em Farmácia.** Editora da Universidade de São Paulo (Edusp). Cap. 11. p. 655. 2003.

GHOSH, S.. Conformational study of papain in the presence of sodium dodecyl sulfate in aqueous médium. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces.** v. 41. p. 209-216. 2005.

GIETZ, U.; ALDER, R.; LANGGUTH, P.; ARVINTE, T.; MERKLE, H.P.. Chemical degradation kinetics of recombinant hirudin (HV1) in aqueous solution: effect of pH. **Pharm. Res.** V. 15, p. 1456-1462. 1998.

GODOY, J.M.F.; PRADO, P.A.. Ácidos gordos essenciais enriquecidos com vitamina A, E e ácido linoleico como pensos em feridas crônicas. Relato de casos. **Rev Port Clin Geral.**;21:193-5 . 2005.

GOLAN, R.; ZEHAVI, U; NAIM, M; PATCHORNIK, A.; SMIRNOFF, P.; HERCHMAN, M.. Inhibition of *Papaya latex* Papain Photosensitive inhibitors. 1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)-2-nitroethene and 1,1-Dicyano-2-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)-ethene. **Journal of protein chemistry.** v. 19, n. 2. p. 117-122. 2000.

GUGGI, D.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A.. Improved paracellular uptake by the combination of different types of permeation enhancers. **international Journal of Pharmaceutics.** v. 288, p. 141-150. 2005.

HELFEBREKERS, B.W.J.; TRIMBOS-KEMPER, T.C.M.; TRIMBOS, J.B.M.Z.; EMEIS, J.J.; KOOISTRA, T.. Use of fibrinolytic agents in the prevention of postoperative adhesion formation. **Fertility and Sterility.** v. 74, n. 2, p. 203-212. 2000.

HEUSSEN, C.; DOWDLE, E.B.. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. **Analytical Biochemistry.** v. 102. p. 196-202. 1980.

HOSPITAL SANTA MARCELINA. **Guia Farmacoterapêutico 2005-2006.** Hospital Santa Marcelina. Serviço de Farmácia. São Paulo. p. 56, 106, 184. 2005.

HWANG, K., IVY, A.C. A review of literature on the potential therapeutic significance of papain. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v. 54, p. 147-296, 1951.

ICH. Validación de métodos analíticos. Asociación Española de Farmacêuticos de la Industria. Barcelona. **Monografía de AEFI**. 2001.

INGLIS, A.S.. single hydrolysis method for al lamino acids, includ cystein and tryptophan. **Methods Enzymol.** V. 91, p. 26-36. 1983.

JAENICKE, R.; ZAVODOZKY, P.. Proteins under extreme physical conditions. **FEBS Lett.** 268 (2), p. 3449. 1990.

JAENICKE, R.. Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. **Eur J. Biochem.** Dec 18, 202 (3), p. 715-728. 1991.

JAENICKE, R.. Stability and stabilization of globular proteins in solution. **Journal of Biotechnology.** V. 79, p. 193-203. 2000.

KAMINSKI, E.; BUSHUK, W.. Detection og multiple forms of proteolytic enzymes by starch gel electrophoresis. **Canadian Journal of Biochemistry.** v. 46, p. 1311-1320. 1968.

KAMPHUIS, I.G.; KALK, K.H.; SWARTE, M.B.A.; DRENT, J.. **J. Mol. Biol.** v. 179, p. 233, 1984.

KATAKAM, M., BELL, L.N.; BANGA, A.K.. Effect of surfactants on the physical stability of recombinant human growth hormone. **J. Pharm. Sci.** v. 84, nº 6, p. 713-716. 1995.

KAYES, J.B.. Disperse systems. In: AULTON, M.E.. **Pharmaceutics: the science of dosage form design**. Editora Churchill Livingstone. cap. 6. p. 84. 1988.

KHAPARDE, S.S.; SINGHAL, P. S.. Chemically modified papain for applications in detergent formulations. **Bioresource Technology.** V. 78, p. 1-4. 2001.

KIMMEL, J.R.; SMITH, E.L.. Crystalline Papain. Preparation, specificity and activation. **J. Biol. Chem.**, v. 207, p. 515-531. 1954.

KIMMEL, J.R.; SMITH, E.L.. The properties of papain. **Advan. Enzymol.**, v. 19, p. 267-334. 1957.

KLASEN, H.J.. A review on the nonoperative removal of necrotic tissue from burn wounds. **Burns.** V 26, p. 207-222. 2000.

KLIBANOV, A.M.; SCHEFILITI, J.A.. On the relationship between conformation and stability in solid pharmaceutical protein formulation. **Biotechnology Letters**. V. 26, p. 1103-1106. 2004.

LAEMMLI, U.K.. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, p. 680-685. 1970.

LAI, M.C.; TOPP, E.M.. Solid-state chemical stability of proteins and peptides. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. V. 88, n. 5, p. 489-500.

LAIDET, B.; LETOUNEUR, M.. Enzymatic debridement of leg ulcers using papain. **Ann. Dermatol. Venereol.** v. 120, n. 3, p. 248. 1993. French.

LEHNINGER. **Princípios de Bioquímica**. Tradução: Arnaldo A. Simões. 2ª Edição. São Paulo. Editora Sarvier. 2000.

LEI, H.; WANG, W.; CHEN, L-L.; LI, X-C; YI, B.;DENG, L.. The preparation and catalytically active characyerization of papain immobilized on magnetic composite microspheres. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 35, p. 15-21. 2004.

LI, S.; NGRUJEN, T.H.; SCHONEICH, C.; BORCHARDT, R.T.. Aggregation and precipitation of human relaxin induced by metal-catalyzed oxidation. **Biochemistry**. 2, v. 34, n. 17, p. 5762-5772. 1995.

LONDRINA, P.M.. **Pregão presencial nº 061/2005** – Autarquia Municipal de Saúde. Londrina. Paraná. p. 1. 2005.

LOPES, P.S.. **Avaliação da eficácia e segurança da papaína como promotor de absorção cutâneo utilizando técnicas biofísicas e cultura celular de queratinócitos humanos**. 215 p. Tese para obtenção do grau de doutor. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de São Paulo – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2003.

LOWRY, O.H.; ROSE BROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J.. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**. V.193, p.265-275. 1951.

MAIA CAMPOS, P.M.G.; BRADA, M.V.L. Estudo da estabilidade física de bases dermocosméticas contendo ésteres fosfóricos. **Aerosol & Cosméticos**. V.79, p. 8-11, 1992.

MANDELBAUM, S.H.; SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S.. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte II. **An bras Dermatol**, Rio de Janeiro, v. 78 (5). p.525-542, set./out. 2003.

MANDELBAUM, S.H.; SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S.. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I. **An. bras. Dermatol.** Rio de Janeiro, 78(4):393:410, jul./ago. 2003.

MANNING, M.C.; PATEL, K.; BORCHARDT, R.T. Stability of protein pharmaceuticals. **Pharm Res.** V. 6, n 11, p. 903-918. 1989.

MAO, Y.; THOMPSON, M.J.; WANG, Q.; TSAI, E.W.. Quantitation of poloxamers in pharmaceutical formulations using size exclusion chromatography and colorimetric methods. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis.** v. 35. p. 1127-1142. 2004.

MAPP, C.E.. Agents, old and new, causing occupational asthma. **Occupational and Environmental Medicine.** V. 58, n. 5, p. 354. 2001.

MARTIN, S.H.C. **J. Physiol.** V. 6, p. 336, 1957.

MARTINDALE: The complete Drug reference. Londres, 34^a Edição. P. 1727-1728. 2005.

MASINI, E.; CALAMO, M. A.. Uma forma de tratamento de lesões cutâneas com papaína e sacarose. **Revista Brasileira Clínica e Terapêutica.** V. XV, n. 8, p. 49-53. 1986.

MEKKES, j.r.; LE POOLE, I.C.; DAS, P.K.; KAMMEYER, A.; WESTERHOF, W.. In vitro Tissue-digesting properties of krill enzymes compared with fibrinolysin/ DNase, papain and placebo. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.** V. 29, n. 4, p. 703-706. 1997.

MERCK Index. 12 Edição. Whitehouse Station. p. 1205. 1996.

METRIONE, R. M.. The thiolesterase activity of sulfhydryl-activated enzymes. **Anal. Biochem.** V. 110, n. 1, p. 122-177.1981.

MICHAUD, D.; FAYE, L.; YELLE, S.. Electrophoretic analysis of plant cystein and serine proteinases using gelatin-containing polyacrylamide gels and class-specific proteinase inhibitors. **Electrophoresis.** p. 14. p. 94-98. 1993.

MITCHEL, R.E.J.; CHAIKEN, I.M.; SMITH, E.L.. **Journal Biology Chemistry.** v. 245, p. 3485. 1970.

MIYAMOTO, D.; WATANABE, J.; ISHIHARA, K.. Effect of water-soluble phospholipid polymers conjugated with papain on the enzymatic stability. **Biomaterials.** V. 25, p. 71-76. 2004.

MONETTA, L.. A importância da atuação científica do enfermeiro na execução dos curativos feitos com papaína. **Revista Paulista de Enfermagem**. V. 9, N. 3, P. 83-87. 1990.

MONETTA, L.. A utilização de novos recursos em curativos num consultório de enfermagem. **Revista Paulista de Enfermagem**. V. 11, N. 1, P. 19-26. 1992.

MONETTA, L. Uso da papaína nos curativos feitos pela enfermagem. **Revista Brasileira de Enfermagem**. v. 40, n.1, jan/fev/mar, p. 66-73, 1987.

MORAES, G.M.; TERMIGNONI, C.; SALAS, C.. Biochemical characterization of a new cysteine endopeptidase from *Carica candamarcensis* L.. **Plant Science**. v. 102. p. 11-18. 1994.

MORISHITA, M., BARICHELO, J.M., TAKAYAMA, K., CHIBA, Y., TOKIWA, S., NAGAI, T.. Pluronic® F-127 gels incorporating highly purified unsaturated fatty acids for buccal delivery of insulin. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 212, p. 289-293. 2001.

MOSQUEIRA, V.C.F.. Penetração de bases dermatológicas. Parte II. **Revista Anfarmaq**. set/out, p. 8-10. 1996.

MOUTIM, V.; SILVA, L.G.; LOPES, M.T.P., FERNANDES, G.W.; SALAS, C.E.. **Plant Science**. v. 142, p. 115. 1999.

NAEEM, A.; FATIMA, S.; KHAN, R.H.. Characterization of partially folded intermediates of papain in presence of cationic, anion and non-ionic detergents at low pH. **Biopolymers**. Apr 5. Accepted Preprint. 2006.

NIINIMÄKI, A.; REIJULA, K.; PIRILÄ, T.; KOISTINEN, A-M.. Papain-induced allerguc rhinoconjunctivitis in cosmetologist. **J. Allergy Clin. Immunol**. v. 92, n. 3, p. 492-493. 1993.

OH, S.H.; KIM, J.K.; SONG, K.S.; NOH, S.M.; GHIL, S.H.; YUK, S.H.; LEE, J.H. Prevention of postsurgical tissue adhesion by anti-inflammatory drug-loaded Pluronic mixtures with sol-gel transition behavior. **Whiley InterScience** (www.interscience.wiley.com). p. 306-316. 2005.

OTUKA, E.S.; PEDRAZZANI, E.S.; PIOTO, M.P.. Uso da papaína na úlcera plantar. **Revista Brasileira de Enfermagem**. v. 49, n.2, abr/jun, p. 207-214, 1996.

ÖZCAN, C.; ERGÜN, O.; CELIK, A.; CÖRDÜK, N.; ÖZOK, G.. Enzymatic debridement of burn wound with collagenase in children with partial-thickness burns. **Burns**. V. 28, p. 791-794, 2002.

OZLEN, S.. Cosmetic composition containing alpha hydroxyacids, salicylic acid, and enzyme mixture of bromelain and papain. **Biotechnology Advances**. V. 4, n. 4, p.562. 1996.

PARK, K. H.; UOOK KIM, Z.; SHIN, J.D., NOH, B.S. Thermal inactivation of crude papain and papaya peroxide. *Hanguk Sikp'um Kwahakhoe Chi*. V. 11, n. 3, p. 171-175. 1979. Apud: **Chem. Abstr**. V. 92, N. 54225v. 1980.

PELLON, M.A.. O curativo cirúrgico diário. In: GOMES, D.R.; SERRA, M.C.V.F.; PELLON, M.A.. **Queimaduras**. 1ª Edição. Rio de Janeiro: Revinter, 1995. Cap. 12, p. 127-138. 1995.

PIEPER, B.; CALIRI, M. H. L.. Nontraditional wound care: a review of the evidence for the use of sugar, papaya/papain, and fatty acids. **Journal Ostomy and Continence Nurses**. V. 30, p. 175-183. 2003.

QUIÑONES, D.; ALONSO, S.; LÓPEZ, R.; SÁNCHEZ, I.; RODRÍGUEZ, F.; FERNÁNDEZ, L.; JEREZ, J.. Urticária de contato, rinoconjuntivitis y asma bronquial ocupacional por papaína. **Allergol. Immunopathol.** Madri. Sep-Oct; V. 27 (5), p. 273-275. 1999. Spanish.

RAICHE, A.T.; PULEO, D.A.. Association polymers for modulated release of bioactive proteins. **IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine**. sept/oct, p. 35-41. 2003.

RICHARDS, F.M.. Protein stability: still an unsolved problem. **Cell. Mol. Life Sci**. V. 53, p. 790-802.1997.

ROCHA, R.P.A.; GURJÃO, W.S.; BRITO Junior, L.C.. Avaliação morfológica da cicatrização lesões ulcerativas assépticas tratadas com soluções de papaína. **VII Congresso Virtual Hispanoamericano de Anatomia Patológica y I Congreso de Preparaciones Virtuales por Internet**. Del al 31 de octubre de 2005. http://www.conganat.org/7congreso/vistalmpresion.asp?id_trabajo=494

ROGENSKI, N.M.B.; GUEDES, M.L.; BAPTISTA, C.M.C.; COSTA, L.D.F.. Uso de papaína em infecções de vísceras. **Revista Brasileira de Enfermagem**. v. 48, n.2, abr/jun, p. 140-143, 1995.

ROSEMBERG, L.; LAPID, O.; BOGDANOV-BEREZOVSKY, A.; GLESINGER, R.; KRIEGER, Y.; SILBERSTEIN, E.; SAGI, A.; JUDKINS, K.; SINGER, A.J.. Safety and efficacy of a proteolytic enzyme for enzymatic burn débridement: a preliminary report. **Burns**. v. 30, p. 843-850. 2004.

ROTH, I.; CLAUNSITZER, I.. **Acta Botanica Venez.** v. 7, p. 187. 1972.

SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R.. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Editora Legis Summa. Ribeirão Preto, 2004.

SAKASHITA, L.H.; BRESCIANE, L.; SILVA, L.C.; HOBBO, N.M.; RIBEIRO, M.E.. Agentes gelificantes. **Aerosol & Cosméticos**. p. 52-58. 1995.

SANCHEZ NETO, R.. **Aspectos morfológicos e morfoméricos da reparação tecidual de feridas cutâneas de ratos com e sem tratamento com solução de papaína a 2%**. Dissertação de Mestrado. Mestrado em Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da Escola Paulista de Medicina. p. 48. 1991.

SANGEETHA, K.; ABRAHAM, T.E.. Chemical modification of papain for use in alkaline médium. **Journal of molecular catalysis B: Enzymatic**. v. 38. p. 171-177. 2006.

SANCHEZ-RUIZ, J.; MAKHATADZE, G.. To charge or not to charge? **TRENDS in Biotechnology**. v. 19, n. 4, p. 132-135. 2001.

SANTOS, E.P.. Enzimas em cosmetologia. **Cosmetic & Toiletries**. Edição em Português. V. 13, p. 66-71. 2001.

SANKALIA, M.G.; MASHRU, R.C.; SANKALIA, J.M.; SUTARIYA, V.B.. papain entrapment in alginate beads for stability improvement and site-specific delivery: physicochemical characterization and factorial optimization using neural network modeling. **AAPS PharmSciTech**. v. 6, i. 2, artigo 31. 2005.

SASMITO, T.; DEMEESTER, J.; BRACKE, M.. Review on the production, properties and uses of papain. **Pharm. Tidschr. Belg**. V. 59, n. 2, p.149-158.1982.

SERRA, M. C. V. F.. A criança queimada. In: GOMES, D.R.; SERRA, M.C.V.F.; PELLON, M.A.. **Queimaduras**. 1ª Edição. Rio de Janeiro: Revinter, 1995. Cap. 6, p. 41-66.

SILVA, L.G.; GARCIA, O.; LOPES, M.T.P. ; SALAS, C.E.. **Braz. J. Med. Biol. Res.**. v. 30, p. 615. 1997.

SILVA, L.R.. Utilizacion del gel de la papaya para la remoción de la caries – reporte de um caso com seguimiento clínico de um año. **Acta odontol. venez.** v. 43. n.2. Caracas. Maio. 2005.

SIM, Y.C.; LEE, S.G.; LEE, D.C.; KANG, B.Y.; PARK, K.M.; LEE, J.Y.; KIM, M.S.; CHANG, I.S.; RHEE, J.S.. Stabilization of papain and lysozyme for application to cosmetic products. **Biotechnology Letters**. V. 22, P. 137-140. 2000.

SINGH, S.. Drug stability testing and shelf-life determination according to international guidelines. **Pharmaceutical Technology**. 1999(a).

SINGH, S.. Stability test storage conditions for Zones III and IV – Some unresolved issues. **Pharmaceutical Technology**. p.131-141. October. 1999(b).

SOTO-MERA, M.T.; LÓPEZ-RICO, M.R.; FILGUEIRA, J.F.; VILAMIL, E.; CIDRÁS, R.. Occupational allergy to papain. **Allergy**. V. 55, n 10, p. 983-984. 2000.

STARLEY, I. F.; MOHAMMED, P.; SCHNEIDER, G.; BICKLER, S. W.. the teratment of paediatric burns using topical papaya. **Burns**. V. 25, p. 636-639. 1999.

STRICKLEY, R.G.; ANDERSON, B.D.. Solid-state stability of human insulin. II. Effect of water on reactive intermediate partitioning in lyophiles from pH 2-5 solutions: stabilization against covalent dimmer formation. **J. Pharm. Sci.** v. 86, n 6, p. 645-53. 1997.

SZABELSKI, M.; STACHOWIAK, K.; WICZK, W.. Influence of organic solvents on papain kinetics. **Acta Biochimica Polonica**. v. 48, n. 4, p. 1197-1201. 2001.

SZABÓ, A.; KOTORMÁN, M.; LACZKÓ, I.; SIMON, L.M.. Spectroscopic studies of stability of papain in aqueous organic solvents. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 41, p. 43-48. 2006.

TAKANO, K.; YAMAGATA, Y.; YUTAMI, K.. A general rule for the relationship between hydrophobic effect and conformational stability of a protein: Stability and structure of a series of hydrophobic mutants os human lysozyme. **J. Mol. Biol.** V. 280, p. 749-761. 1998.

TANG, K. E.S.; DILL, K.A.. Native protein fluctuations: conformational-motion temperature and the inverse correlation of protein flexibility with protein stability. **J. Biomol. Struct. Dyn.** V. 16, p. 397-411. 1998.

TIRAS, U.; ERDEVE, O.; KARABULUT, A.A.; DALLAR, Y.; EKSIOGLU, H.M.. Debridement via collagenase application in two neonates. **Pediatric Dermatology**. v. 22. n. 5. p. 472-475. 2005.

TRAVERSA, E. **Desenvolvimento de formulações cosméticas contendo papaína e avaliação da sua eficácia depilatória sobre o folículo piloso**. 160 p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de São Paulo. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2003.

USP XXIX: **United States Pharmacopeia**. Convention, Rockford, MD. p. 2699-2701. 2006.

VANDENPLAS, O.; VANDEZANDE, L.M.; HALLOY, J.L.; DELWICHE, J.P.; JAMART, J.; LOOZE, Y.. Association between sensitization to natural rubber latex and papain. **J. Allergy Clin. Immunol.** v. 97, p. 1421-4. 1996.

VELASCO, M.V.R.. **Desenvolvimento e padronização de gel contendo papaína para uso tópico**. 144 p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de São Paulo. Universidade de São Paulo. São Paulo, 1993.

VICENTE, L.C.; AIRES-BARROS, R.; EMPIS, J.M.A.. Stability and proteolytic activity of papain in reverse micellar and aqueous media: a kinetic and spectroscopic study. **J. Chem. Tech. Biotechnol.** v. 60, p. 291-297. 1994.

VOET, D.; VOET, S.. **Biochemistry**. 2ª edição. John Wiley & Sons, Inc.. Nova York. p. 85. 1995.

VRKLJAN, M.; FOSTER, T.M.; POWERS, M.E. et al. Thermal stability of low molecular weight urokinase during heat treatment. Part. 2. Effect of polymeric additives. **Pharm. Res.** V. 11, p. 1004-1008. 1994.

WALSH, G.; HEADON, D.. **Protein Biotechnology**. Ed. John Wiley & Sons. Chichester, Chapter 6. 1994.

WANG, W. Oral protein drug delivery. **J. Drug Target.** V. 4, p. 195-232. 1996

WANG, W.. Instability, stabilization, and formulations of liquid protein pharmaceuticals. *international Journal of Pharmaceuticals*. v. 185. p. 129-188. 1999.

WANG, P-L.; JOHNSTON, T.P.. Enhanced stability of two model proteins in an agitated solution environment using poloxamer 407. **J. Parenter. Sci. Technol.** V. 47, p. 183-189, 1993.

WEERT, M.V.; STEENBERGEN, M.J.V.; CLELAND, J.L.; HELLER, J.; HENNINK, W.E.; CROMMELIN, D.J.A.. Semisolid, self-catalyzed poly (ortho ester)s as controlled-release systems: protein release and protein stability issues. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. V. 91, n. 4, p. 1065-1074. 2002.

ZATZ, J.L.; KUSHIA, G.P.. Gels. In: LIEBERMAN, H.A.; RIEGER, M.M.; BANKER, G.S.. **Pharmaceutical dosage forms: Disperse systems**. v. 2, cap. 10, p. 399-421. 2ª Edição. New York. 1996.

ZERHOUMI, S.; AMRANI, A.; NIJS, M.; SMOLDERS, N.; AZARKAN, M.; VINCENTELLI, J.; LOOZE, Y.. **Biochemical and Biophysical Acta**. v. 1387, p. 275. 1998.

ZHUANG, P.; BUTTERFIELD, D.A.. Denaturation studies of active-site labeled papain using electron paramagnetic resonance and fluorescence spectroscopy. **Biophys. J.** v. 60, p. 623-628, 1991.