

Avaliação da estabilidade e da atividade enzimática de soluções de papaína utilizadas no desbridamento e cicatrização de feridas

Evaluation of the stability and the enzymatic activity of papain solutions used in the debridement and wound healing

Recebido em: 02/07/2016

Aceito em: 18/09/2016

Júlio César BORELLA^{1,2}; Renata Filliettaz SIMÕES¹;

Robison Leandro Aparecido PUGA¹; Marise C. Bastos STEVANATO¹

¹Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP). Av. Costabile Romano, 2201, Ribeirão Preto, SP. CEP 14096-380, Brasil. ²Laboratório de Manipulação Farmacêutica da Secretaria Municipal da Saúde de Ribeirão Preto. Rua Campos Salles, 1297, Ribeirão Preto, SP. CEP 14015-110. Brasil.

E-mail: jborella@unaerp.br

ABSTRACT

Papain solutions (2 % w/v, 6 % w/v and 10 % w/v) used in debridement and wound healing, were prepared without and with pharmaceutical adjuvants (propylene glycol, EDTA and methyl paraben) and were stored in environments with different temperatures (5-10 °C and 30-35 °C). Some analyses were performed during the storage: organoleptic analysis, pH, microbiological contamination and enzymatic activity (milk-clotting method). The results showed that pH and organoleptic aspects are not reliable guides to monitor changes in enzymatic activity in the solutions. There were no problems concerning microbiological contamination of the solutions during the evaluation period. Storage environments with lower temperatures can maintain high enzymatic activities of the solutions. There was not a proportional increase of the maximum enzymatic activity of the solutions without adjuvants and the concentration of papain in the formulations. Initially, the papain solutions without adjuvants exhibited enzymatic activity three to five times higher than the other samples, but there was rapid decrease. Therefore, papain solutions should be used in the form of extemporaneous preparations in dressings. On the other hand, solutions with adjuvants have their enzymatic activities preserved for a longer time.

Keywords: papain, production of products, quality control, microbiological analysis, enzyme stability.

RESUMO

Soluções de papaína (2% m/v, 6% m/v e 10% m/v), utilizadas no desbridamento e cicatrização de feridas, foram preparadas sem e com adjuvantes farmacotécnicos (propilenoglicol, EDTA dissódico e metilparabeno) e foram estocadas em ambientes com diferentes temperaturas (5-10 °C e 30-35 °C). Análises organolépticas, de pH, contaminação microbiológica e atividade enzimática (método de coagulação do leite) foram realizadas durante o período de estocagem. Os resultados mostraram que aspectos organolépticos e pH não são guias confiáveis para monitorar as variações de atividade enzimática nas soluções. Não houve problemas em relação à contaminação microbiológica das soluções durante o período de avaliação. Ambientes de estocagem com temperaturas mais baixas conseguem manter elevadas as atividades enzimáticas das soluções. Não se observou aumento proporcional entre a atividade enzimática máxima das soluções sem adjuvantes e a concentração de papaína presente nas formulações. Inicialmente as soluções de papaína sem adjuvantes exibiram de três a cinco vezes maiores suas atividades enzimáticas, mas houve rápido decaimento. Deste modo, deve-se utilizá-las nos curativos, na forma de preparações extemporâneas. Por outro lado, as atividades enzimáticas das soluções com adjuvantes se mantem por maior período, após preparo.

Palavras-chave: papaína, produção de medicamentos, controle da qualidade, análise microbiológica, estabilidade enzimática.

INTRODUÇÃO

A papaína é uma enzima (cisteína protease) com propriedades proteolíticas que é obtida a partir do látex dos frutos verdes de *Carica papaya* (mamão). A ação catalítica da papaína está intimamente ligada à sua estrutura tridimensional, que é constituída por dois distintos domínios estruturais com uma fenda entre eles. Esta fenda contém o sítio catalítico, denominado “tríade catalítica”, que é constituído dos aminoácidos cisteína-25, histidina-159 e aspartato-158. A ação enzimática também é dependente da manutenção do estado reduzido do grupamento tiol da cisteína-25 (1, 2).

Soluções desta enzima têm inúmeras utilizações terapêuticas, entre elas, o uso em curativos de feridas. Essa indicação é dependente das características de cada fase da cicatrização. Em casos de feridas secas ou com tecido de granulação, a indicação é o uso de soluções na concentração de 2 % m/v. Em presença de exsudato purulento com infecções, a concentração indicada é de 6% m/v. Em presença de tecido necrótico abundante, recomenda-se a utilização de papaína na concentração de 10 % m/v (3). Por outro lado, a agência norte-americana que regula o registro de alimentos e medicamentos naquele país, *Food and Drug Administration* (4), proíbe a comercialização de produtos tópicos a base de papaína, com a alegação de produzirem efeitos nocivos, inclu-

do hipersensibilidade resultante de reações anafiláticas, devido à alergia ao látex.

No entanto, problemas mais comuns com a utilização de soluções de papaína estariam relacionados com a instabilidade química e com contaminação microbiológica, com repercussões na atividade enzimática, essencial para o desenvolvimento da atividade terapêutica (5). Os problemas citados podem estar relacionados com a temperatura e o tempo de estocagem das soluções. Outro fator que pode ser citado como interferente desse processo está relacionado com as características da formulação farmacêutica, onde o uso, ou não, de adjuvantes farmacotécnicos pode interferir na estabilidade do princípio ativo e na proliferação de microrganismos (6, 7).

Deste modo, na tentativa de contribuir para a compreensão dessa situação e melhoria da forma de uso dessas preparações, o presente trabalho visa avaliar a estabilidade e a atividade enzimática de soluções de papaína com e sem uso de adjuvantes farmacotécnicos, estocados em diferentes temperaturas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Insumos e formulações. Para o presente estudo, Sete formulações foram preparadas para desenvolvimento desse experimento, conforme indicado na Tabela 1.

Tabela 1: Formulações das soluções de papaína (m/v)

	Branco	Com adjuvantes			Sem adjuvantes		
		2%	6%	10%	2%	6%	10%
Papaína	0,000	2,000	6,000	10,000	2,000	6,000	10,000
EDTA(Na) ₂	0,004	0,004	0,004	0,004	0,000	0,000	0,000
Metilparabeno	0,180	0,180	0,180	0,180	0,000	0,000	0,000
Propilenoglicol	15,000	15,000	15,000	15,000	0,000	0,000	0,000
Água pur. qsp	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000

Todos os insumos citados na Tabela 1 eram grau farmacopeico e foram obtidos dos seguintes fornecedores: papaína 6000 UI/mg (70 Upe) (5) marca Allchemistry (lote: ALL056679); EDTA dissódio DEG (lote: 100820#2); metilparabeno Fagron (lote: 13093869B); propilenoglicol Fagron (lote: 14073478A) e água purificada, obtida no Laboratório de Manipulação Farmacêutica (lote: AP.05.15).

Os certificados de análises emitidos pelos fornecedores foram avaliados e também foram realizados testes de controle da qualidade dos insumos constantes na

Farmacopeia Brasileira 5ª edição (8) e foram aprovados para serem utilizados em preparações farmacêuticas.

Após o preparo das soluções, 100 g das mesmas foram acondicionadas em frascos escuros fechados, lacrados e rotulados.

Condições de estocagem. Cada tipo de formulação foi estocado em duas diferentes condições:

I. Em ambiente cuja temperatura se manteve entre 5-10 °C durante todo o período de estocagem (em geladeira, marca Elber modelo Re 280).

II. Em ambiente cuja temperatura se manteve entre 30-35 °C durante todo o período de estocagem (em estufa, marca Marconi modelo MA032/4).

Tanto as formulações quanto as condições de estocagem foram estabelecidas em virtude de serem as mais usualmente utilizadas para preparo e estocagem de formulações contendo papaína (6, 7, 9).

Avaliações realizadas. A partir do preparo e estocagem, as soluções foram submetidas a análise organoléptica, determinação do pH, análise microbiológica e determinação da atividade enzimática. Foram submetidas às análises três amostras (n=3) de cada um dos tipos de soluções, em cada ambiente de estocagem. Cada procedimento analítico foi realizado em triplicata. As médias foram empregadas para apresentação dos resultados. Para a atividade enzimática foram calculadas as médias de desvio padrão para expressar as variações dos dados.

A periodicidade das avaliações se realizou, de modo consecutivo, do seguinte modo: no tempo zero (logo após o preparo das soluções); diariamente (até o terceiro dia, 72 horas após preparo); semanalmente (durante o primeiro mês. 4 semanas após preparo) e mensalmente (a partir do segundo mês, após preparo). As avaliações realizadas nesta periodicidade foram mantidas até que a atividade enzimática de cada uma das soluções fosse praticamente nula.

Análises organolépticas. As características organolépticas fornecem dados simples, porém normalmente relevantes sobre o estado do material analisado. Foram avaliados o aspecto geral, homogeneidade e odor.

Determinação do pH. Foi realizada a metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (8), empregando aparelho de marca Orion modelo 420A. A aferição do aparelho foi realizada com as leituras de soluções tampão (pH = 4,0 e pH = 7,0) imediatamente antes da determinação do pH da solução-teste.

Análise microbiológica. As técnicas realizadas visaram a contagem de microrganismos viáveis e foram utilizados os meios de cultura Sabouraud (avaliação do crescimento de fungos) e TSA (avaliação do crescimento de bactérias). As amostras foram submetidas ao tratamento com solução neutralizante, com a finalidade de inativar os conservantes utilizados e possibilitar completa homogeneização das amostras. O possível isolamento de coliformes totais e fecais, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* foi tentado usando os meios de cultura MacConkey, Cetrimida e Vogel-Johnson. As soluções de papaína foram diluídas na proporção de 1:10;

1:100 e 1:1000, antes da semeadura nos meios de cultura, e previamente incubadas para recuperação dos microrganismos pesquisados (10, 11). Outras provas bioquímicas não foram realizadas, pois o foco da análise foi para a utilização de formulações farmacêuticas para uso tópico.

Tabela 2: Valores mínimos e máximos de pH observados durante o período de estocagem das soluções de papaína

Soluções	5-10 °C geladeira	30-35 °C estufa
Branco	5,5-6,0	4,9-5,2
2% com adjuvantes	5,0-6,0	4,9-5,2
6% com adjuvantes	4,8-5,3	4,8-5,3
10% com adjuvantes	4,8-5,2	4,9-5,2
2% sem adjuvantes	5,1-5,5	5,1-6,2
6% sem adjuvantes	5,1-6,0	5,1-5,6
10% sem adjuvantes	5,1-5,3	5,1-5,3

Determinação da atividade enzimática. Foi utilizado o método de coagulação do leite, que se fundamenta na alteração das características de um substrato proteico durante período de incubação (12). Por esse método, 1 g da solução de papaína foi adicionado em 10 g de solução de ácido acético 0,01% (m/m) e essa mistura adicionada a 10 mL de leite (2,5 g do leite em pó desnatado em 100 g de água), previamente aquecido, em banho de água, até a temperatura de 50 °C. Essa mistura foi agitada até o primeiro sinal de formação de coágulos. O tempo decorrido para a formação do coágulo, a partir da adição da amostra ao leite, foi empregado no cálculo da atividade enzimática, que foi expressa em unidade de potência de coagulação do leite por grama de solução de papaína (Upe):

$$Upe = \frac{1000}{Ext}$$

Onde:

E: massa (mg) de solução necessária para precipitar 10 mL do substrato (leite) no tempo t (min)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

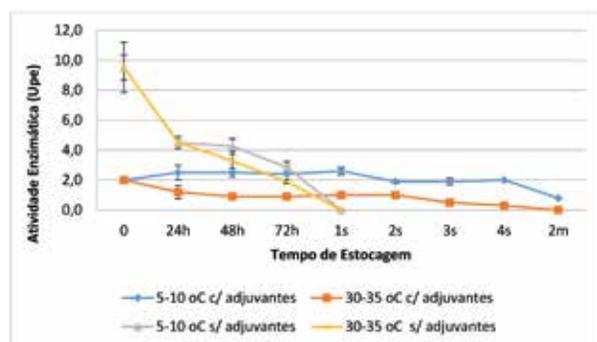
Com relação às análises organolépticas, foi observado que, durante todo período de avaliação, as características de aspecto geral, homogeneidade e odor se mantiveram inalteradas para todos os tipos de soluções analisadas, em quaisquer dos ambientes de estocagem. Tanto para as soluções de papaína (com adjuvantes), quanto para as soluções de papaína (sem adjuvantes) foi observado um líquido viscoso, homogêneo, amarelo cla-

ro, com odor característico de enxofre. Para as amostras que não continham papaína (branco) foi observada uma solução viscosa, transparente e inodora.

O pH das diversas soluções foi acompanhado durante o período de estocagem e os intervalos de variação (valor mínimo e máximo) são apresentados na Tabela 2.

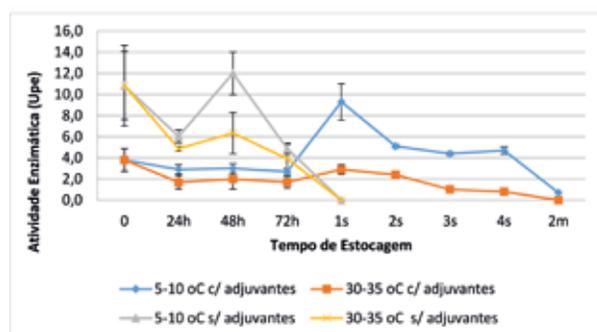
Todas as avaliações relativas à contaminação microbiológica das soluções contendo ou não papaína, na diluição de 1:10 das amostras, com ou sem uso de adjuvantes, nas duas condições de estocagem, não mostraram qualquer crescimento de microrganismos (<10 UFC/mL) nas culturas com TSA, Sabouraud, MacConkey, Cetrimida e Vogel-Johnson.

As Figuras 1, 2 e 3 mostram as atividades enzimáticas das soluções durante o período de estocagem. A solução-branco foi avaliada e resultou na inexistência de atividade enzimática nessa formulação (Upe = zero), tanto para armazenagem na geladeira (5-10 °C), quanto na estufa (30-35 °C), durante todo o período de estocagem.



h = hora; s = semana; m= mês; barra de erros referem-se ao desvio padrão da média

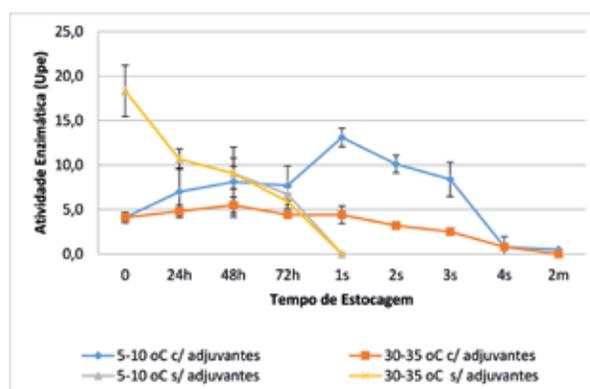
Figura 1: Variação da atividade enzimática das soluções de papaína 2% durante período de estocagem



h = hora; s = semana; m= mês; barra de erros referem-se ao desvio padrão da média

h = hora; s = semana; m= mês; barra de erros referem-se ao desvio padrão da média

Figura 2: Variação da atividade enzimática das soluções de papaína 6% durante período de estocagem



h = hora; s = semana; m= mês; barra de erros referem-se ao desvio padrão da média

h = hora; s = semana; m= mês; barra de erros referem-se ao desvio padrão da média

Figura 3: Variação da atividade enzimática das soluções de papaína 10% durante período de estocagem

As soluções, que continham adjuvantes farmacotécnicos na composição, foram elaboradas no sentido de obter maior estabilidade e manutenção da atividade enzimática. Nessas soluções foram acrescentados, além da papaína, propilenoglicol, usado como cossolvente poliidroxilado, na tentativa de melhor estabilizar a enzima, por causar menor interação da enzima com a água. O EDTA dissódico também foi utilizado, pois a papaína é uma enzima que, quando nativa, exibe o grupamento tiol da cisteína-25 bloqueada, apresentando por este motivo, nesse instante, baixa atividade enzimática. A ativação desse grupamento pode ser obtida com adição de agentes redutores moderados. Neste caso, o EDTA foi empregado para ativar a enzima para sua ação catalítica, mantendo livre e reduzido o grupamento tiol da cisteína-25. O metilparabeno foi usado como agente antimicrobiano, na tentativa de prolongamento da vida útil das soluções, em relação à contaminação microbiológica (6, 7).

Com relação à temperatura de estocagem, em todas as concentrações avaliadas, com ou sem uso de adjuvantes, maiores valores de atividade enzimática foram encontrados nas preparações armazenadas entre 5-10 °C (geladeira). Estes dados vêm ao encontro do que se descreve na literatura que apontam a perda de atividade enzimática da papaína na presença de temperaturas mais elevadas, responsáveis por provocar alterações na estrutura química da enzima, principalmente na “tríade catalítica” (2).

Inicialmente, as soluções preparadas sem adição de adjuvantes exibiram maiores atividades enzimáticas, quando comparadas com aquelas formuladas com adjuvantes. As soluções 2 % m/v tiveram quase cinco vezes

maior a atividade enzimática e as soluções a 6 % m/v e 10% m/v, de três a quatro vezes maiores. No entanto, as soluções sem adjuvantes rapidamente tiveram decaimento na atividade enzimática, fato que não foi observado nas soluções preparadas com os adjuvantes. Esse decaimento rápido que sofreram as soluções sem adjuvantes parece estar de acordo com dados da literatura que citam a queda de 60 % da atividade enzimática para soluções aquosas de papaína 2 % m/v, com armazenagem a 5 °C, após 2 dias do preparo (13).

Tendo como parâmetro os picos de atividade enzimática detectados, não foi observado aumento proporcional entre as diversas concentrações de papaína nas soluções sem uso de adjuvantes e suas atividades enzimáticas. Estas soluções apresentaram para papaína 2 % m/v: 9,52 Upe; para papaína 6 % m/v, 12,00 Upe; e papaína 10% m/v, 18,33 Upe. Esses dados podem ser explicados pelo mecanismo natural de abertura da papaína, que acarreta em perda de atividade enzimática em soluções aquosas, que é proporcional às massas molares contidas nas soluções (2, 14). Por outro lado, as soluções com adjuvantes apresentaram para papaína 2 % m/v, 2,60 Upe; para papaína 6 % m/v, 9,30 Upe; e papaína 10% m/v, 13,10 Upe.

Esse comportamento mais proporcional em relação à atividade enzimática se deveu, principalmente, pelo uso do propilenoglicol, que pode interferir na interação da papaína com a água e, por decorrência, no processo de abertura da enzima.

Avaliando somente as soluções com uso de adjuvantes que foram armazenadas na geladeira (5-10 °C), as atividades enzimáticas se mantiveram ou tenderam a aumentar nos primeiros dias de estocagem, chegando a um máximo com uma semana depois do preparo. A partir daí ocorreu decréscimo dessa ação e, após dois meses do preparo das soluções, elas exibiram atividade enzimática praticamente nula. Esses dados podem ser explicados pela gradual ativação dos sítios catalíticos presentes em porções da enzima disponível na solução (aumento da atividade enzimática) e pela alteração da estrutura proteica (diminuição da atividade enzimática) (6). Desta forma, parece que a adição dos adjuvantes farmacotécnicos (propilenoglicol e EDTA dissódico) foi capaz de estabilizar a ação catalítica e retardar a desnaturação da papaína. Fato semelhante também foi observado em estudos com formulações cosméticas contendo papaína modificada por meio de reações com polietilenoglicol (6).

Embora fique evidente a grande alteração no poder catalítico das soluções analisadas durante o período de

estocagem, isto não foi capaz de alterar significativamente o pH destas soluções. Conforme indicado na monografia da papaína na USP 29 (15), soluções aquosas de papaína 2 % (m/v) podem exibir pH entre 4,8 a 6,2. Todas as soluções testadas, inclusive a solução-branco e soluções de papaína em outras concentrações, com ou sem adjuvantes, não ficaram fora desta faixa de pH, mostrando que os resultados desta avaliação não tiveram qualquer correlação com as atividades enzimáticas apresentadas pelas soluções.

A mesma observação pode ser mencionada em relação às análises organolépticas, pois independentemente da atividade enzimática que as soluções testadas possuíam, os mesmos caracteres foram observados, durante todo o período de avaliação, em quaisquer temperaturas de estocagem.

Foi observado também que não houve problemas em relação à contaminação microbiológica das preparações, independentemente da temperatura utilizada para a estocagem, pois não houve qualquer tipo de crescimento bacteriano ou fúngico nas amostras utilizadas para avaliação. Deste modo, poder-se-ia deduzir que o uso de metilparabeno seria desnecessário, pois as soluções sem adjuvantes não tiveram qualquer tipo de contaminação. No entanto, as análises de contaminação microbiológica realizadas sobre essas soluções foram feitas somente até a primeira semana de estocagem, quando suas atividades enzimáticas foram extintas, enquanto que para as soluções que continham adjuvantes, as análises se estenderam por dois meses após o preparo.

CONCLUSÕES

Após avaliação dos resultados apresentados, pode ser concluído que as análises organolépticas e a determinação do pH não são guias confiáveis em relação às variações de atividade enzimática das soluções de papaína.

Contaminações microbiológicas não se mostraram como fator de risco para o armazenamento das soluções de papaína, tanto na geladeira como na estufa, e nenhum agente deletério foi evidenciado nessas avaliações, quer seja pelo curto espaço de tempo de estocagem (para as soluções sem adjuvantes), quer seja pela utilização de agentes conservantes na formulação (para as soluções com adjuvantes).

Ambientes de estocagem com baixas temperaturas (5-10 °C/geladeira) se mostraram mais eficientes na manutenção da atividade enzimática das soluções de pa-

papaína com ou sem uso de adjuvantes, em detrimento de ambientes com temperaturas mais elevadas (30-35 °C/ estufa).

Soluções de papaína sem adjuvantes tem inicialmente maiores atividades enzimáticas, porém essa condição se deteriora rapidamente. Desta forma, a indicação para sua utilização seria como soluções extemporâneas em curativos, quando se desejasse maior potência enzimática.

Não foi observado aumento proporcional entre a atividade enzimática máxima das soluções sem adjuvantes e a concentração de papaína presente nas formulações. Por outro lado, as soluções de papaína com adjuvantes parecem se apresentar mais proporcionais em relação a este quesito, além da sua manutenção durante a estocagem. No entanto, suas atividades enzimáticas iniciais são três a cinco vezes menores do que aquelas apresentadas inicialmente pelas soluções sem uso de adjuvantes.

REFERÊNCIAS

1. Borella JC, Stevanato MCB. Análise sazonal da produção e da atividade enzimática de látex fresco coletado de frutos de plantas femininas e hermafroditas de mamão (*Carica papaya* L.). Rev Brasil Plantas Med. 2015; 17(4 Suppl 3):1112-1117. DOI 10.1590/1983-084X/15_002
2. Amri E, Mamboya F. Papain, a plant enzyme of biological importance: a review. Am J Biochem Biotechn. 2012; 8(2):99-104. DOI 10.3844/ajbbsp.2012.99.104
3. Brito Jr. LC, Ferreira PL. Cicatrização de feridas contaminadas tratadas com papaína. Medicina (Ribeirão Preto). 2015; 48(2):168-174.
4. FDA. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Topical drug products containing papain; enforcement action dates. Federal Register. 2008; 73(185):54831-54834.
5. Borella JC, Pádua M, Stevanato MCB. Estudo comparativo para avaliação da qualidade de amostras de papaína comercializadas por empresas fornecedoras de insumos farmacêuticos do estado de São Paulo. Ver Eletrôn Farmácia. 2015; 12(4):24-31. DOI: 10.5216/ref.v12i4.36598
6. Pinto CASO. Estudo comparativo da estabilidade de formulações cosméticas contendo papaína livre e modificada [Dissertação]. São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. 2005.
7. Miura DY. Desenvolvimento farmacotécnico e estudo de estabilidade de géis de papaína destinados ao tratamento de feridas [Dissertação]. Niterói. Universidade Federal Fluminense. 2012.
8. BRASIL. Farmacopeia Brasileira. 5ª ed. volume I. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2010.
9. Leite AP, Oliveira BGRB, Soares MF, Barrocas DLR. Uso e efetividade da papaína no processo de cicatrização de feridas: uma revisão sistemática. Rev. Gaúcha Enferm. 2012; 33(3):198-207. DOI 10.1590/S1983-14472012000300026
10. Bou-Chacra NA, Ohara MT. Validação de método para avaliação da qualidade sanitária de preparação cosmética de base lipófila. Braz. J. Pharm. Sci. 2003; 39(2):185-194. DOI 10.1590/S1516-93322003000200009
11. Winn Jr. W, Allen SJW, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Koneman - Diagnóstico microbiológico. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008.
12. Andrade-Mahecha MM, Morales-Rodriguez O, Martinez-Correa HA. Estudo do processo de extração de papaína a partir do látex do fruto de mamão (*Carica papaya* L.) cv. Maradol. Acta Agron. 2011; 60(3):219-225.
13. Velasco de Paola MVR, Rodrigues LB, Dazzi C, Yamamoto JK, Kaneko TM. Avaliação da estabilidade da solução de papaína 2% p/v pelo método de coagulação do leite. Rev Farm Quím São Paulo. 1999; 32(4):8-13.
14. Kamphuis IG, Kalk KH, Swarte MBA, Drenth J. Structure of papain refined at 1.65Å resolution. J Mol Biol. 1984; 179(2):233-256. DOI 10.1016/0022-2836(84)90467-4
15. USP. United States Pharmacopeia. 29 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2006.