

Atividade antibacteriana *in vitro* de géis com diferentes concentrações de papaína***In vitro* antibacterial activity of gels with different papain concentrations****Actividad anti-bacteriana *in vitro* de geles con diversas concentraciones de la papaína**

Adriano Menis Ferreira^I, Evandro Watanabe^{II}, Andresa Piacuzzi Nascimento^{III},
Denise de Andrade^{IV}, Izabel Yoko Ito^V

RESUMO

A papaína é uma enzima proteolítica proveniente do mamão, *Carica papaya* Linn., e é muito empregada na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica. Objetivou-se determinar a atividade antibacteriana *in vitro* de géis com diferentes concentrações de papaína frente às bactérias padrão: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Echerichia coli* (ATCC 10538), bem como 4 *Pseudomonas aeruginosa* hospitalares. Aliquotas de 2,0ml dos inóculos bacterianos (metade da escala 1,0 de McFarland) foram semeadas em duplicata na superfície de placas de Petri. Os géis com as diferentes concentrações de papaína foram gotejados na superfície dos meios de cultura pela técnica de gotejamento e a incubação realizada a 35°C por 24 horas. A leitura dos resultados da atividade antibacteriana foi efetuada pela mensuração dos halos de inibição ao redor das gotas dos géis de papaína. Apenas o gel de papaína a 10% foi capaz de inibir o crescimento do *S. aureus* e de 2 *P. aeruginosa*. Em conclusão, de acordo com a literatura a papaína apresenta ação proteolítica sobre os tecidos mortos, porém apenas a formulação em gel a 10% apresentou atividade antibacteriana *in vitro*. Assim, antes de utilizar alguma substância ou produto contra microrganismos é necessário saber se a mesma apresenta realmente atividade antimicrobiana.

Palavras chave: Papaína; Cicatrização de feridas; Infecção dos ferimentos; Infecção hospitalar.

ABSTRACT

The papain is a proteolytic enzyme from papaya, *Carica papaya* Linn., and it is so used in food, cosmetic and pharmaceutical industry. The aim of this study was to determine *in vitro* antibacterial activity of gels with different papain concentrations against standard bacteria: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) and *Echerichia coli* (ATCC 10538), as well as 04 hospital *Pseudomonas aeruginosa*. Aliquots of

2.0ml from bacterial inocula (0.5 McFarland scale) were seeded in duplicate onto Petri plates' surface. The papain gels with different concentrations were dropped onto culture medium surface by the drop technique and the incubation realized at 35°C for 24 hours. The results of antibacterial activity were obtained by measuring of growth inhibition halos around the drops of papain gels. Only the papain gel 10% was able to inhibit *S. aureus* and 2 *P. aeruginosa* growth. In conclusion, according to literature the papain has action on dead tissues, but only the gel formulation 10% presented *in vitro* antibacterial activity. So, before using any substance or product against microorganisms it is necessary to know if it really has antimicrobial activity.

Key words: Papain; Wound healing; Wound infection; Cross Infection.

RESUMEN

La papaína es una enzima proteolítica de la papaya, *Carica papaya* Linn., y es muy utilizado en la industria del alimento, cosmética y farmacéutica. La puntería de este estudio era determinar la actividad anti-bacteriana *in vitro* de geles con diversas concentraciones de la papaína contra bacterias estándares: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) y

^I Enfermeiro. Doutor em Enfermagem, Professor do Departamento de Enfermagem da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – Campus Três Lagoas (MS). E-mail: a.amr@ig.com.br.

^{II} Farmacêutico. Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP (FCFRP-USP). Doutorando em Biociências Aplicadas à Farmácia pela FCFRP-USP. E-mail: evandrowatanabe@gmail.com.

^{III} Biomédica. Mestre e Doutoranda em Biociências Aplicadas à Farmácia pela FCFRP-USP. E-mail: piacuzzi@fcfrp.usp.br.

^{IV} Enfermeira. Profa. Livre Docente do Departamento de Enfermagem Fundamental da EERP-USP. E-mail: dandrade@eerp.usp.br.

^V Farmacêutica. Profa. Titular do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP-USP. E-mail: izabyito@fcfrp.usp.br.

Echerichia coli (ATCC 10538), así como 4 *Pseudomonas aeruginosa* del hospital. Alícuotas de 2,0ml de inóculos bacterianos (0,5 de la escala McFarland) fueron sembradas por duplicado en la superficie de placas de Petri. Los geles con diferentes concentraciones de papaína fueron goteados en la superficie de los medios de cultura por la técnica de goteo y la incubación se celebró a 35°C por 24 horas. La lectura de los resultados fue hecha por la medición de los halos de inhibición alrededor de las gotas de geles. Solamente el gel el 10% de

la papaína fue capaz de inhibir el crecimiento de *S. aureus* y de 2 *P. aeruginosa*. En la conclusión, según la literatura la papaína tiene acción en tisúes muertos, pero solamente la formulación el 10% del gel presentó actividad anti-bacteriana *in vitro*. Así pues, antes de usar cualquier sustancia o producto contra microorganismos es necesario saber si realmente tiene actividad anti-microbiana.

Palabras clave: Papaína; Herida curativa; Infección de la herida; Infección cruzada.

INTRODUÇÃO

A papaína é originária do látex das folhas e dos frutos do mamão verde adulto (*Carica papaya* Linn.), e é uma enzima proteolítica muito empregada na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica⁽¹⁾.

Sua atividade enzimática é decorrente principalmente da presença de um radical sulfidril (SH) pertencente ao aminoácido cisteína⁽²⁾.

A papaína é, após seu preparo, um pó de cor leitosa, com odor forte e característico, lembrando enxofre. É solúvel em água e glicerol, mas praticamente insolúvel em álcool, éter e clorofórmio. Além disso, pode ser inativada ao reagir com agentes oxidantes como ferro, oxigênio, derivados de iodo, água oxigenada, nitrato de prata, luz e calor. Por ser uma enzima de fácil deterioração deve ser mantida em ambiente fresco e seco e protegida da luz⁽³⁾.

No Brasil, Monetta⁽²⁾ foi a primeira autora a reportar cientificamente os resultados da utilização da papaína *in natura*, bem como diluída no tratamento de feridas. No entanto, o uso da papaína já é consagrado na literatura internacional desde a década de 50⁽¹⁾.

Essa enzima tem sido utilizada em pacientes com diferentes características, faixas etárias e feridas, sem o relato de efeitos colaterais^(1,3-5). No entanto, pacientes que apresentam reação alérgica ao látex também podem apresentá-la à papaína⁽⁶⁾.

Essa substância auxilia na remoção de exsudatos inflamatórios e células mortas, reduzindo o período necessário para o reparo tecidual, sem afetar o tecido íntegro ao redor da lesão. Ainda, facilita a cicatrização da ferida,

tornando-a mais próxima da estrutura original. Assim, a papaína digere os restos teciduais e constituintes insolúveis do exsudato inflamatório (fibrina e material genético das células mortas) e os transformam em peptídeos quimiotáticos para os fibroblastos, que estimulam precocemente a fibroplastia/cicatrização^(1,3,4-5).

A papaína é capaz de degradar qualquer proteína que contém resíduos de cisteína, como é o caso dos fatores de crescimento. Por outro lado, o colágeno não é degradado por essa enzima, visto que não apresenta o aminoácido cisteína em sua composição⁽⁷⁾.

No tratamento de feridas, a papaína pode ser administrada em diferentes formas farmacêuticas, como pó, gel, creme e soluções nas concentrações de 2 a 5%⁽⁸⁾. Além disso, outras concentrações como as de 1 a 4% podem ser empregadas em tecidos fibrinosos ou de granulação e a de 10% em tecidos necrosados⁶. Ao contrário do que muitos pensam, a papaína pode ser utilizada durante todas as fases de cicatrização das feridas, variando apenas sua concentração⁽⁹⁻¹⁰⁾.

A forma farmacêutica em gel da papaína apresenta vantagens no tratamento de feridas, uma vez que mantém o ambiente úmido da ferida, condição primordial para o processo de cicatrização. Além disso, pode ser facilmente aplicada e delimitada na lesão, bem como pode ser removida facilmente por meio de lavagem com solução fisiológica⁽¹⁰⁾.

O gel de papaína foi padronizado a 0,4% com duas diferentes bases comerciais (Carbopol 940[®] e Acrisint 400[®]) e manutenção a 5°C (em geladeira), 22°C e 37°C durante 57 dias. As bases dos géis de papaína apresentaram

características físico-químicas semelhantes. No entanto, as atividades enzimáticas da papaína nas três diferentes condições de temperatura de armazenamento reduziram a menos de 50%, após o período de 57 dias. Embora, o gel mantido a 5°C apresentasse uma menor perda da sua atividade enzimática, não estatisticamente significativa, sugeriram armazená-lo nessa temperatura⁽¹⁾.

Outras características dessa substância é a atividade bacteriostática e bactericida^(1,11). Em um estudo foi demonstrada a atividade antibacteriana do extrato dos frutos da *Carica papaya* contra algumas bactérias comumente encontradas em feridas, no entanto, mais estudos são necessários para avaliar a atividade antibacteriana de diferentes formulações de papaína para o tratamento de feridas⁽¹²⁾.

Portanto, o objetivo deste estudo foi determinar a atividade antibacteriana *in vitro* de géis com diferentes concentrações de papaína (1, 2, 3, 4, 6, 8 e 10%) frente a algumas bactérias padrão e hospitalares, que são relevantes em infecções de feridas.

MATERIAL E MÉTODO

O experimento microbiológico *in vitro* foi efetuado no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, entre os períodos de março a junho de 2007.

A atividade antibacteriana dos géis de papaína (1, 2, 3, 4, 6, 8 e 10%) foi realizada frente às:

- Bactérias padrão: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Escherichia coli* (ATCC 10538);
- Bactérias hospitalares: 4 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

As bactérias isoladas foram semeadas em tubos com meio de cultura *Muller Hinton Agar* – Oxoid, Basingstake, Hampshire, UK (MH) e incubadas a 35°C por 24 horas. Decorrido o período de incubação, suspensões bacterianas em soluções fisiológicas foram feitas a partir dessas culturas jovens, com turvação correspondente à metade da escala 1,0 de McFarland.

Técnica de Gotejamento

Alíquotas de 2,0ml dos inóculos bacterianos (metade da escala 1,0 de McFarland) foram semeadas em duplicata na superfície de placas de Petri (20x100mm) com meio de cultura MH, sendo o excesso removido com o auxílio de pipeta automática e absorvido com tiras de papel filtro. A superfície do meio de cultura foi seca após abertura das placas em uma cabine de fluxo laminar (VECO, Campinas, SP, BR) por 15 minutos.

Os géis de papaína a 1, 2, 3, 4, 6, 8 e 10% foram gotejados na superfície dos meios de cultura pela técnica de gotejamento. Em cada placa foram gotejadas 7 gotas (os géis com as diferentes concentrações de papaína), sendo que 6 delas a cerca de 2,0cm da borda da placa e nos vértices de um hexágono regular, enquanto que sétima amostra no centro da placa.

O gotejamento foi realizado com auxílio de uma seringa descartável (5,0ml) com agulha (12x40mm), e a incubação a 35°C por 24 horas.

A leitura dos resultados da atividade antibacteriana foi efetuada pela mensuração dos halos de inibição ao redor das gotas dos géis de papaína.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A papaína apresentou atividade proteolítica (0,1; 0,5 e 1,0%), diminuindo a massa da crosta da queimadura e melhorando a cicatrização⁽¹³⁾.

Um estudo *in vitro* com sementes de *Carica papaya* demonstrou atividade antibacteriana (*Bacillus cereus*>*E. coli*>*Enterococcus faecalis*>*S. aureus*>*Proteus vulgaris*>*Shigella flexneri*). A atividade observada foi independente do grau de maturação do fruto. A papaína tem efeito antibacteriano que pode ser de utilidade para o tratamento de feridas crônicas da pele, promovendo a cicatrização⁽¹⁴⁾.

De baixo custo e amplamente utilizada, a polpa do mamão amassada pode ser aplicada diariamente em toda a extensão de tecidos queimados e infectados. Parece ser efetiva na prevenção de infecções de feridas relacionadas a queimaduras. O seu possível mecanismo de

ação inclui a atividade proteolítica das enzimas quimiopapaína e papaína, bem como sua atividade antimicrobiana, no entanto mais estudos são necessários⁽¹⁵⁾.

Pesquisadores⁽¹⁶⁾ ao avaliar a atividade antimicrobiana de folhas de mamão (*C. papua* Linn) frente a *E. coli* e *S. aureus* e não observaram qualquer atividade antibacteriana.

Um estudo⁽¹²⁾ demonstrou que os extratos dos frutos da *Carica papaya* (epicarpo, endocarpo e sementes) apresentaram atividade antibacteriana frente a *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Shigella flexineri*. O mesmo não ocorreu com o extrato das folhas, o qual

não foi capaz de inibir esses microrganismos. As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos extratos dos frutos foram menores para as bactérias Gram-positivas (0,2-0,3mg/ml) do que para as Gram-negativas (1,5-4,0mg/ml).

A papaína em gel foi escolhida para esse estudo, uma vez que esse tipo de veículo é o mais comumente utilizado no tratamento de feridas.

Nossos resultados demonstraram que apenas o gel de papaína na concentração de 10% foi capaz de inibir o crescimento do *S. aureus* e de duas cepas de *P. aeruginosa* (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição das bactérias padrão e hospitalares, segundo a atividade antibacteriana *in vitro* (halo de inibição) dos géis com diferentes concentrações de papaína. Ribeirão Preto, 2007.

	1%	2%	3%	4%	6%	8%	10%
<i>P. aeruginosa</i> (1)	-	-	-	-	-	-	120mm
<i>P. aeruginosa</i> (2)	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> (3)	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> (4)	-	-	-	-	-	-	20mm
<i>E. coli</i> (ATCC 10538)	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	-	-	-	-	-	-	75mm

- sem atividade antibacteriana.

Embora tenhamos observado efeito antibacteriano para algumas cepas, temos que interpretar esses resultados com cautela uma vez que a única concentração que causou inibição foi a de 10%, conforme observada na

Figura 1. Na prática clínica essa concentração é utilizada apenas para feridas com alta quantidade de tecido necrótico e/ou desvitalizado⁽²⁾.

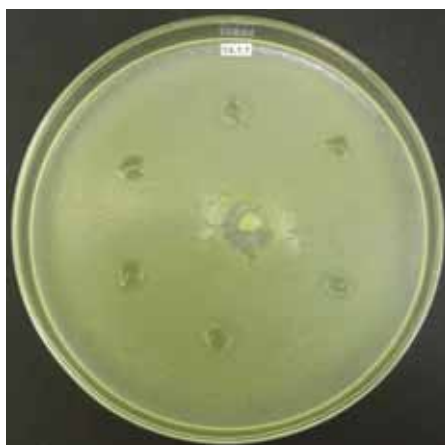


Figura 1. Distribuição da atividade antibacteriana *in vitro* dos géis com diferentes concentrações (em sentido horário) e na concentração de 10% (no centro) frente a *P. aeruginosa* (1). Ribeirão Preto, 2007.

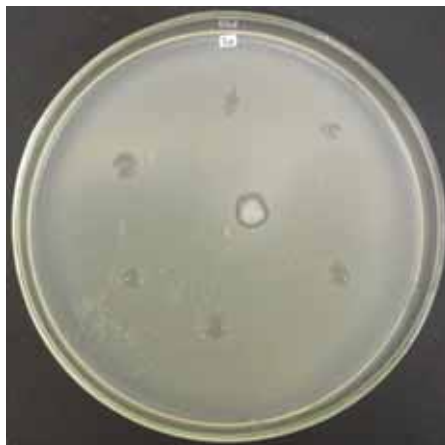


Figura 2. Distribuição da atividade antibacteriana *in vitro* dos géis com diferentes concentrações (em sentido horário) e na concentração de 10% (no centro) frente a *S. aureus* (ATCC 6538). Ribeirão Preto, 2007.

A escolha dessas bactérias nesse estudo é justificada pelo fato de estarem presentes tanto em feridas agudas como em crônicas⁽¹⁷⁾.

Alguns trabalhos utilizaram a papaína para auxiliar na cicatrização de feridas e foram unânimes em descrever, entre outras, a ação antimicrobiana dessa substância^(1-2,4,8-9,11).

Bactérias aeróbicas são capazes de degradar tecidos de feridas através da produção de uma variedade de fatores de virulência, como enzimas e toxinas (fibrinolisinase, hialuronidase, hemolisina, leucocidina e exotoxina A)⁽¹⁸⁾. Portanto, a infecção de feridas é um problema contínuo para muitos pacientes, porque feridas infectadas podem causar angústias associadas à morbidade e mortalidade, aumento dos dias de internação, retardo na cicatrização, desconforto, e elevação dos custos do tratamento. Dessa forma, a partir dos resultados dessa pesquisa, deve-se ter cautela em indicar somente a papaína como agente antibacteriano no tratamento de feridas e adicionais estudos *in vitro* e *in vivo* são necessários.

Acreditamos que o efeito antibacteriano da papaína no tratamento de feridas seja devido a sua atividade proteolítica⁽¹⁻⁴⁾ capaz de degradar tecidos desvitalizados do leito das feridas. Assim, a retirada do tecido desvitalizado traz consigo as bactérias que nele estão aderidas, diminuindo o nível de contaminação da ferida e melhorando a cicatrização tecidual⁽¹⁶⁾.

Há de se considerar que estudos *in vitro*, envolvendo a utilização de substâncias ou produtos em feridas devem ser interpretados com cautela na prática clínica, visto que as

substâncias analisadas entram em contato direto com as bactérias, fato que não acontece na ferida, pois há, por exemplo, a presença de exsudato e tecido desvitalizado⁽¹⁹⁾.

CONCLUSÃO

De acordo com as evidências apresentadas, antes de utilizar alguma substância ou produto contra microrganismos é necessário saber se a mesma apresenta realmente atividade antimicrobiana. O gel de papaína na concentração de 10% mostrou ter atividade antibacteriana em 50% das bactérias analisadas. No entanto, na prática clínica os resultados devem ser interpretados com cautela e efeitos colaterais relevantes como ardência, e/ou desconforto na ferida são essenciais para um tratamento seguro e com qualidade.

REFERÊNCIAS

1. Velasco MVR. Desenvolvimento e padronização de gel contendo papaína para uso tópico [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo; 1993.
2. Silva LM. Efeitos benéficos da papaína no processo terapêutico de lesões de pele. In Jorge AS, Dantas SRPE. Abordagem multiprofissional do tratamento de feridas. São Paulo: Atheneu; 2003. p. 123-132.
3. Sanches Neto R. Aspectos morfológicos e morfométricos da reparação tecidual de feridas cutâneas de ratos com e sem tratamento com solução de papaína a 2% [dissertation]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina; 1991.

4. Moneta L. O uso da papaína nos curativos feitos pela enfermagem. Rev Bras Enferm. 1987;40(1):66-73.
5. Ferreira AM, Poletti NAA, Pereira APS, Ribeiro RCHM. O curativo de lesões abdominais por deiscência de sutura. Revista Nursing. 2002. 5(53):29-34.
6. Pieper B, Caliri MHL. Nontraditional wound care: a review of the evidence for the use of sugar, papaya/papain, and fatty acids. J Wound Ostomy Continence Nurs. 2003;30:175-83.
7. Falanga V. Wound bed preparation and the role of enzymes: a case for multiple actions of therapeutic agents. Wounds. 2002;14(2):47-57.
8. De Paola MVRV, Rodrigues LB, Dazzi C, Yamamoto JK, Kaneko TM. Avaliação da estabilidade da solução de papaína 2% p/v pelo método da coagulação do leite. Farmácia & Química. 1999;32(4):8-13.
9. Monetta L. Análise evolutiva do processo de cicatrização em úlceras diabéticas, de pressão e venosas com uso de papaína [dissertation]. São Paulo: Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo; 1998.
10. Otuka, ES, Pedrazzani ES, Pioto MP. O uso da papaína na úlcera plantar. Rev Bras Enferm. 1996; 49(2):207-214.
11. Moneta L. A utilização de novos recursos em curativos num consultório de enfermagem. Rev Paul Enfermagem. 1992; 11(1):19-26.
12. Emeruwa AC. Antibacterial substance from *Carica papaya* fruit extract. J Nat Prod. 1982; 45(2):123-7.
13. Rakhimov MR.[Pharmacological study of papain from the papaya plant cultivated in Uzbekistan]. Eksp Klin Farmakol. 2000;63(3):55-7. Russian.
14. Dawkins G, Hewitt H, Wint Y, Obiefuna PC, Wint B. Antibacterial effects of *Carica papaya* fruit on common wound organisms. West Indian Med J. 2003;52(4):290-2.
15. Starley IF, Mohammed P, Schneider G, Bickler SW. The treatment of paediatric burns using topical papaya. Burns. 1999;25(7):636-9.
16. Vieira RH, Rodrigues DP, Gonçalves FA, Menezes FG, Aragão JS, Sousa OV. Microbicidal effect of medicinal plant extracts (*Psidium guajava* Linn. and *Carica papaya* Linn.) upon bacteria isolated from fish muscle and known to induce diarrhea in children. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 2001;43(3):145-8.
17. Bowler PG, Davies BJ. The microbiology of acute and chronic wounds. Wounds. 1999;11(4):72-78.2.
18. Enoch S, Harding K. Wound bed preparation: the science behind the removal of barriers to healing. Wounds. 2003;15(7):213-229.
19. Davis SC, Bouzari, N. Development of antimicrobials for wound care: in-vitro and in-vivo assessments. Wounds. 2004;16(11):344-347.

Artigo recebido em 10.10.07.

Aprovado para publicação em 31.12.08.