

Caracterização da atividade proteolítica da papaína e sua incorporação em filmes biopoliméricos para aplicações cosméticas

Giordana Madruga Abreu¹
Laís Noujaim Silveira¹
João Gustavo Provesi²

Resumo: O presente trabalho analisou a papaína, enzima proteolítica obtida do látex do mamão verde (*Carica papaya* L.), como agente bioativo incorporado em filmes poliméricos à base de amido e carboximetilcelulose (CMC) para aplicação em formulações cosméticas. A atividade enzimática da papaína comercial foi determinada pelo método de hidrólise da caseína, com leitura espectrofotométrica a 290 nm e quantificação indireta dos produtos liberados por meio de curva padrão de tirosina. Os resultados evidenciaram comportamento linear da liberação de tirosina ao longo do tempo, com atividade enzimática total e específica dentro da faixa reportada na literatura para papaína comercial de grau analítico, confirmando a integridade catalítica da enzima e a adequação do método empregado. O efeito do pH sobre a atividade proteolítica foi avaliado na faixa de 2 a 12, identificando-se o pH 7 como ótimo (100% de atividade relativa). No pH 6, a enzima manteve cerca de 89% da atividade máxima, com redução expressiva em condições extremas (8% no pH 2 e 5% no pH 12), comportamento coerente com o mecanismo da dupla catalítica Cys25-His159. Os filmes poliméricos foram produzidos pelo método de casting em duas concentrações de papaína (1 mg/mL e 10 mg/mL) e caracterizados quanto ao teor de umidade e solubilidade. Os filmes com maior concentração enzimática apresentaram valores significativamente superiores em todas as propriedades avaliadas ($p < 0,05$), evidenciando a influência da papaína na estrutura da matriz polimérica. Os achados confirmam a viabilidade da incorporação da papaína em filmes de amido e carboximetilcelulose, indicando potencial aplicação no desenvolvimento de formulações cosméticas sustentáveis com atividade esfoliante.

Palavras-chave: Papaína; Atividade proteolítica; Filmes poliméricos; Amido; Formulações cosméticas.

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda por produtos de origem natural na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia tem impulsionado a busca por biomoléculas com propriedades funcionais bem definidas e de fácil obtenção a partir de matérias-primas renováveis. Nesse contexto, as enzimas de origem vegetal têm ganhado destaque como alternativas sustentáveis aos agentes

1 Acadêmicas do curso de Engenharia Química do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina (IFSC) - Campus Lages. giordanaabreu14@gmail.com; laisns8@hotmail.com

2. Orientador - Docente do curso de Engenharia Química - IFSC - Campus Lages. joao.provesi@ifsc.edu.br

sintéticos, combinando eficácia, biocompatibilidade e menor impacto ambiental ao longo de sua cadeia produtiva.

A papaína é uma enzima proteolítica da classe das cisteíno-proteases, extraída do látex do mamão verde (*Carica papaya* L.), fruta amplamente cultivada em regiões tropicais e subtropicais, com o Brasil figurando entre os principais produtores mundiais. Sua estrutura molecular é composta por uma cadeia polipeptídica de aproximadamente 212 aminoácidos, com sítio ativo dependente de resíduo de cisteína, o que confere à enzima elevada capacidade de clivagem de ligações peptídicas em substratos proteicos variados (TREVISOL et al., 2023).

As propriedades catalíticas da papaína têm sido amplamente exploradas em diferentes setores industriais e científicos. Na indústria alimentícia, a enzima é empregada como amaciante de carnes, agindo diretamente sobre as proteínas miofibrilares e do tecido conjuntivo, além de ser utilizada no processamento de cervejas para prevenir a formação de turbidez proteica durante o resfriamento. Na indústria farmacêutica, a papaína tem sido estudada como agente de desbridamento enzimático em feridas crônicas, promovendo a remoção seletiva de tecido necrótico sem comprometer o tecido viável adjacente. Na área cosmética, sua capacidade de degradar proteínas específicas da pele a torna um ativo interessante para formulações de cuidados com a pele. Na biotecnologia, é amplamente utilizada em processos de digestão proteica para fins analíticos, como na preparação de fragmentos de anticorpos e na hidrólise de substratos em ensaios bioquímicos (CAPUCHO, 2007).

Apesar de seu amplo potencial de aplicação, a papaína apresenta limitações relacionadas à sua estabilidade, sendo suscetível à inativação por agentes oxidantes, variações de temperatura, pH extremos e presença de íons metálicos. Tais características tornam indispensável a caracterização detalhada de sua atividade enzimática antes de qualquer processo de formulação ou aplicação industrial, uma vez que a eficácia do produto final está diretamente condicionada à manutenção da atividade catalítica da enzima nas condições de uso (TREVISOL et al., 2023).

A determinação da atividade enzimática constitui, portanto, etapa fundamental no desenvolvimento de produtos à base de papaína, permitindo quantificar com precisão o potencial catalítico da enzima, estabelecer parâmetros de qualidade para sua utilização e avaliar o impacto de diferentes condições de processamento sobre sua funcionalidade. O método de hidrólise da caseína, amplamente descrito na literatura, é considerado um protocolo robusto e reproduzível para essa finalidade, possibilitando a quantificação indireta da atividade proteolítica por meio da liberação de aminoácidos aromáticos mensuráveis por espectrofotometria (TREVISOL et al., 2023).

A incorporação da papaína em matrizes biopoliméricas tem sido investigada como estratégia para potencializar sua aplicação. Na área cosmética, Trevisol et al. (2023) produziram máscaras faciais ativas a partir de filmes de amido e carboximetilcelulose (CMC) contendo papaína pelo método de casting, demonstrando que a incorporação preservou a atividade proteolítica da enzima por até 90 dias e conferiu atividade esfoliante *in vitro* sobre proteínas da pele. Na área farmacêutica e de curativos, estudos demonstraram a imobilização da papaína em membranas de celulose bacteriana oxidada, obtendo materiais com elevada estabilidade enzimática, biocompatibilidade e capacidade de desbridamento de tecidos necróticos (VASCONCELOS et al., 2024). De forma análoga, Almeida et al. (2021) imobilizaram com sucesso a papaína em filmes de celulose bacteriana reticulada com glutaraldeído, confirmando a incorporação por espectroscopia e microscopia eletrônica e evidenciando propriedades antibacterianas do material obtido. Em conjunto, esses estudos reforçam o potencial das matrizes biopoliméricas como suportes para a papaína, favorecendo sua estabilidade e liberação controlada em aplicações tópicas.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar a atividade enzimática da papaína comercial por meio da hidrólise da caseína, bem como avaliar suas propriedades após incorporação em filmes poliméricos à base de amido e carboximetilcelulose (CMC), caracterizando os filmes obtidos quanto ao teor de umidade, solubilidade e grau de intumescimento. O trabalho foi desenvolvido no contexto da valorização de insumos de origem nacional e da busca por formulações bioativas sustentáveis, contribuindo para o avanço do conhecimento sobre o comportamento da papaína em matrizes biopoliméricas e para sua potencial aplicação em produtos de uso tópico.

2 METODOLOGIA

2.1 Materiais

O projeto foi desenvolvido no laboratório de Química Orgânica e Bioquímica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina (IFSC), Campus Lages. A papaína utilizada foi de grau analítico (Dinâmica, São Paulo). Os demais reagentes — caseína (Dinâmica, São Paulo), tirosina (Dinâmica, São Paulo), ácido tricloroacético (TCA) (Êxodo Científica, São Paulo), tampão fosfato 100 mM (Êxodo Científica, São Paulo), amido (Alphatec, São José), CMC (Synth, São Paulo), glicerol (Quimidrol, Santa Catarina) e ácido cítrico (Dinâmica, São Paulo) — também foram de grau analítico.

2.2 Determinação da Atividade Enzimática da Papaína

A atividade enzimática foi determinada por dois métodos complementares: a) hidrólise da caseína, conforme descrito Trevisol et al. (2023) e b) hidrólise da gelatina, conforme descrito por Souza et al. (2017).

2.2.1 Método 1 — Hidrólise da Caseína

Foram separados 13 tubos Falcon de 15 mL, identificados conforme os grupos experimentais: branco (B, n = 1) e quatro tempos de reação — 5, 10, 15 e 20 minutos — com três réplicas cada. Em todos os tubos foram adicionados 1,0 mL da solução de caseína 0,65% (m/v) e 1,0 mL de solução tampão fosfato 100 mM (pH 7,5). Nos tubos dos grupos experimentais foram adicionados 1,0 mL da solução de papaína (1 mg/mL), enquanto no branco foram adicionados 1,0 mL de água destilada em substituição à enzima.

As reações foram conduzidas em banho termostatizado a 37 °C, sendo os tubos retirados ao atingir os respectivos tempos de incubação. Imediatamente após cada retirada, a reação foi interrompida pela adição de 1,0 mL de solução de TCA 10% (m/v). As amostras foram então resfriadas até a temperatura ambiente e centrifugadas por 5 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante de cada tubo foi coletado e a absorbância mensurada em espectrofotômetro a 290 nm, utilizando cubeta de quartzo.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de tirosina por minuto nas condições experimentais.

Para a quantificação dos peptídeos liberados, foi utilizada uma curva padrão de tirosina nas concentrações de 0, 50, 100, 200, 400, 600, 800 e 1000 mg/L, preparadas em triplicata pela diluição de uma solução-mãe de tirosina 1 mg/mL em água destilada, com pH ajustado para aproximadamente 7,0. As leituras de absorbância foram realizadas a 290 nm nas mesmas condições descritas anteriormente. Os dados foram tabulados no formato tempo × absorbância e a atividade específica foi obtida pela divisão da atividade total pela concentração de proteína da amostra.

A curva padrão de tirosina foi construída a partir de soluções preparadas em concentrações crescentes de 0 a 1000 µg/mL, com leitura de absorbância realizada a 290 nm em triplicatas, utilizando espectrofotômetro UV-Vis (Biospectro, modelo SP-22, Curitiba, Brasil).

2.2.3 Método 2 — Hidrólise da Gelatina

Como método complementar, para avaliação qualitativa da atividade proteolítica, foi utilizada a hidrólise da gelatina. A gelatina incolor foi dissolvida conforme orientação do fabricante: misturada à água quente e posteriormente resfriada à temperatura ambiente antes do uso. Foram preparadas e

adicionadas diferentes proporções de solução de papaína e água destilada, mantendo volume constante de gelatina em todos os tubos, conforme descrito na Tabela 1. Os tubos foram levados à geladeira e, após período de resfriamento, foi registrada a formação ou não de gel em cada tubo, indicando a extensão da hidrólise proteolítica.

Tabela 1 – Esquema de tubos para avaliação da atividade proteolítica por hidrólise da gelatina

Tubo	Sol. papaína (mL)	Água destilada (mL)	Gelatina (mg)
1	2	0	400
2	1,5	0,5	400
3	1	1	400
4	0,5	1,5	400
5	0,25	1,75	400
6	0	2	400

2.3 Efeito do pH sobre a atividade proteolítica da papaína

O efeito do pH sobre a atividade proteolítica da papaína foi avaliado utilizando a hidrólise da caseína como reação modelo, seguindo a mesma metodologia descrita na seção 2.2.1, com adaptações referentes ao ajuste do pH do meio reacional. O ensaio foi conduzido na ausência de tampão fosfato, sendo o pH de cada condição ajustado diretamente pela adição de volumes apropriados de HCl 0,1 N ou NaOH 0,1 N à solução de caseína 0,65% (m/v). Os valores de pH avaliados foram 2, 4, 6, 7, 8, 10 e 12, abrangendo uma ampla faixa ácida, neutra e alcalina, de forma a mapear o comportamento catalítico da enzima em condições extremas e intermediárias de pH, conforme recomendado por Grzonka *et al.* (2001) e Trevisol *et al.* (2022).

Para cada valor de pH, as reações foram conduzidas em triplicata sob as mesmas condições padronizadas no ensaio de atividade: temperatura de 37 °C, tempo de incubação de 20 minutos em banho termostatizado e interrupção da reação por adição de 1,0 mL de solução de TCA 10% (m/v). Após centrifugação a 8170 × g por 5 minutos, a absorbância do sobrenadante foi medida a 290 nm em espectrofotômetro com cubeta de quartzo.

A atividade relativa de cada condição foi calculada em relação à maior atividade obtida entre os valores de pH testados, tomada como referência e definida como 100%, conforme a equação 4. Esse procedimento permite expressar o comportamento da enzima em função do pH de forma normalizada

e comparável, independentemente das variações absolutas de atividade entre experimentos (Trevisol *et al.*, 2022).

$$Atividade\ Relativa\ (\%) = \frac{Atividade}{Atividade\ inicial} \times 100 \quad (1)$$

2.4 Preparo dos Filmes Poliméricos

Os filmes biodegradáveis ativos foram produzidos por meio do método de fundição (*casting*), adaptado a partir de metodologia descrita na literatura (Trevisol *et al.*, 2023; Ghanbarzadeh *et al.*, 2011). O sistema polimérico foi constituído por uma mistura de amido solúvel e carboximetilcelulose (CMC) na proporção de 1:1 (p:p), utilizando ácido cítrico como agente de reticulação, glicerol como agente plastificante e a enzima papaína como componente ativo em duas concentrações distintas (1 mg/mL e 10 mg/mL).

Para a preparação da primeira matriz polimérica (Solução A), dispersou-se amido solúvel na concentração de 5% (p/v) em água destilada sob agitação mecânica constante à temperatura ambiente. Em seguida, incorporou-se ácido cítrico a 0,5% (p/v) à dispersão, e a mistura foi submetida a aquecimento controlado a 80 °C sob agitação contínua por 30 minutos, visando promover a gelatinização do amido e a reticulação das cadeias poliméricas. Após o aquecimento, a solução foi resfriada até a temperatura ambiente.

Paralelamente, foram preparadas duas soluções ativas independentes à temperatura ambiente (Solução B), sob agitação mecânica. Massas predeterminadas de papaína foram dissolvidas em água destilada nas concentrações de 1 mg/mL e 10 mg/mL, respectivamente. Após a completa solubilização da enzima, adicionou-se CMC a 1% (p/v) em cada sistema, mantendo-se a agitação até a homogeneização completa.

Na etapa de mistura, alíquotas de 112,5 mL da Solução A e 112,5 mL de cada Solução B foram combinadas sob agitação mecânica à temperatura ambiente, totalizando 225 mL por formulação, respeitando a proporção polimérica de 1:1 (p:p). Durante esse processo, adicionou-se glicerol como plastificante na concentração de 1,15% (p/v). As soluções filmogênicas permaneceram em repouso durante a noite à temperatura ambiente para eliminação de bolhas de ar por dessorção natural.

Após esse período, 20 g de cada solução filmogênica foram vertidos sobre placas acrílicas. A secagem foi conduzida em estufa de secagem à 30°C por 36 horas à temperatura ambiente. Os filmes formados foram cuidadosamente destacados dos suportes e transferidos para um dessecador com sílica gel para que não absorvesse umidade do ambiente externo por 24 horas antes das etapas de caracterização.

2.5 Caracterização dos Filmes Poliméricos

2.5.1 Teor de Umidade

A determinação do teor de umidade dos filmes poliméricos foi realizada pelo método gravimétrico por secagem em estufa, conforme descrito pela norma ABNT NBR 6457. As amostras foram cortadas em corpos de prova de aproximadamente 2 × 2 cm e transferidas para cadinhos previamente secos e tarados. O conjunto cadinho mais amostra foi pesado em balança analítica, registrando-se a massa inicial (M_0).

Em seguida, os cadinhos contendo as amostras foram levados à estufa a 70 °C, temperatura ideal para promover a remoção da umidade sem causar degradação térmica do material polimérico. As amostras permaneceram na estufa até atingirem massa constante, verificada por pesagens sucessivas em intervalos de 2 horas, considerando-se constante quando a variação entre duas pesagens consecutivas foi inferior a 0,1% da massa. Após a secagem, os cadinhos foram transferidos para dessecador contendo sílica gel e resfriados até a temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos, evitando a reabsorção de umidade do ar, e então pesados novamente, registrando-se a massa final (M_f). O teor de umidade foi calculado pela equação 1, onde M_0 corresponde à massa inicial da amostra úmida e M_f à massa após secagem completa.

$$U(\%) = [(M_0 - M_f) / M_0] \times 100 \quad (1)$$

2.5.2 Solubilidade e Grau de Intumescimento

A determinação da solubilidade dos filmes poliméricos foi realizada por método gravimétrico de imersão em solvente, baseado na variação de massa antes e após o contato com o meio de dissolução. As amostras foram cortadas em corpos de prova de aproximadamente 2 × 2 cm, secas em estufa a 70 °C até massa constante, resfriadas em dessecador e pesadas em balança analítica, registrando-se a massa inicial seca (M_0).

Os corpos de prova foram individualmente transferidos para frascos de vidro com tampa contendo volume suficiente de solvente para a imersão completa das amostras. As amostras permaneceram imersas por 24 horas à temperatura ambiente, sendo avaliadas visualmente em intervalos regulares quanto à ocorrência de dissolução total, dissolução parcial, intumescimento ou ausência de alteração aparente.

Após o período de imersão, as amostras que não sofreram dissolução total foram retiradas com auxílio de pinça, com o excesso de solvente superficial removido suavemente com papel absorvente, e imediatamente pesadas, registrando-se a massa úmida (M_u). Em seguida, as amostras foram

novamente secas em estufa a 70 °C até a massa constante, resfriadas em dessecador e pesadas, registrando-se a massa final seca (Mf). O grau de intumescimento (GI), que expressa a capacidade do solvente de penetrar na matriz polimérica sem dissolvê-la, foi calculado pela equação 2. A perda de massa (ΔM), que indica a fração do material solubilizada ou extraída pelo solvente, foi calculada pela equação 3.

$$GI(\%) = [(Mu - Mo) / Mo] \times 100 \quad (2)$$

$$\Delta M(\%) = [(Mo - Mf) / Mo] \times 100 \quad (3)$$

2.6 Análise estatística

As análises de atividade enzimática e teor de umidade dos filmes foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. Para a análise de solubilidade, além da apresentação dos dados como média $\pm$ desvio padrão de triplicatas, a comparação entre as formulações (Amido/CMC + papaína 1 mg/mL e Amido/CMC + papaína 10 mg/mL) foi realizada por meio de Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de comparação de médias de Tukey, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$), permitindo verificar se a concentração de papaína incorporada exerceu efeito estatisticamente significativo sobre o grau de intumescimento e a perda de massa dos filmes.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

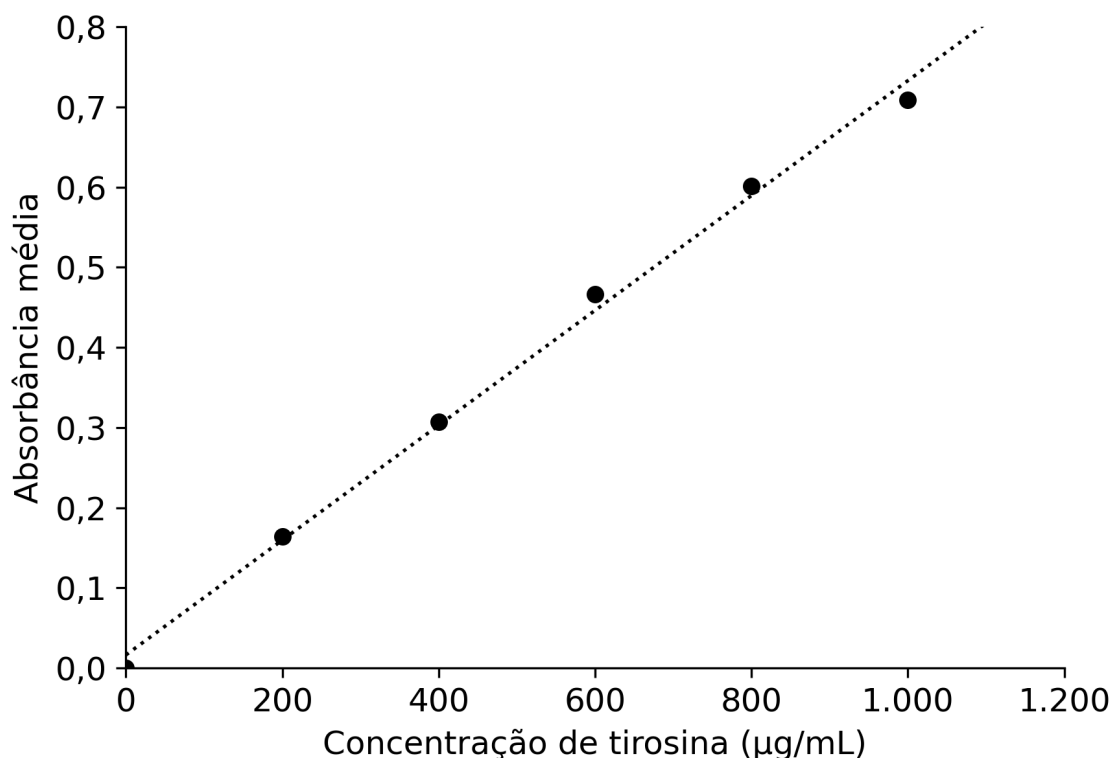
3.1 Atividade Enzimática da Papaína por Hidrólise da Caseína

Os dados obtidos apresentaram comportamento linear ao longo de toda a faixa de concentração avaliada, conforme ilustrado na Figura 1. O ajuste linear resultou na equação $y = 0,0007x + 0,0163$, com coeficiente de determinação $R^2 = 0,9961$, demonstrando linearidade entre a absorbância e a concentração de tirosina no intervalo estudado.

O elevado valor de R^2 obtido confirma a adequação do modelo linear para descrever a relação entre absorbância e concentração nas condições experimentais adotadas, validando a curva para uso como ferramenta de quantificação indireta dos produtos da hidrólise enzimática. A linearidade da curva padrão é um critério essencial para a confiabilidade do método espectrofotométrico, pois garante que variações de absorbância observadas nas amostras possam ser convertidas em concentrações de forma precisa e

reprodutível, sem distorções decorrentes de desvios do comportamento da Lei de Beer-Lambert (SKOOG et al., 2014).

Figura 1 - Curva padrão da tirosina elaborada para quantificação da atividade enzimática



A tirosina foi escolhida como padrão de referência por ser um dos principais aminoácidos aromáticos liberados durante a hidrólise da caseína pela papaína, sendo seu coeficiente de absorção molar a 290 nm bem estabelecido na literatura. A absorção nesse comprimento de onda é característica de aminoácidos contendo anel aromático, especialmente tirosina e triptofano, e é amplamente empregada para a quantificação indireta da atividade proteolítica em ensaios com caseína como substrato (TREVISOL et al., 2022; CAYLE, 1971). A equação da reta obtida foi utilizada diretamente para a conversão dos valores de absorbância registrados nas amostras do ensaio de hidrólise em concentrações equivalentes de tirosina, possibilitando o cálculo subsequente da atividade enzimática total e específica da papaína.

Após a obtenção da curva de calibração, foi verificada então a atividade enzimática da papaína comercial, conforme apresentado na Figura 2. O ajuste linear dos dados resultou na equação $y = 24,538x + 514,2$, com coeficiente de determinação $R^2 = 0,9929$, indicando linearidade e confirmando que a enzima atuou em condições de velocidade constante durante o intervalo de tempo estudado. A inclinação da reta, que corresponde à velocidade de liberação de

tirosina, foi de 24,538 μg de tirosina por minuto (Tabela 2).

A conversão da velocidade para unidades molares, considerando que 1 μmol de tirosina equivale a 181,19 μg , resultou em uma velocidade de reação de 0,1354 μmol de tirosina por minuto. Com base nessa velocidade e na quantidade de enzima presente em cada tubo (10 mg), foram calculados a atividade enzimática total e o valor de atividade específica da papaína (Tabela 2).

Figura 2 – Atividade enzimática da papaína comercial via método de hidrólise da caseína

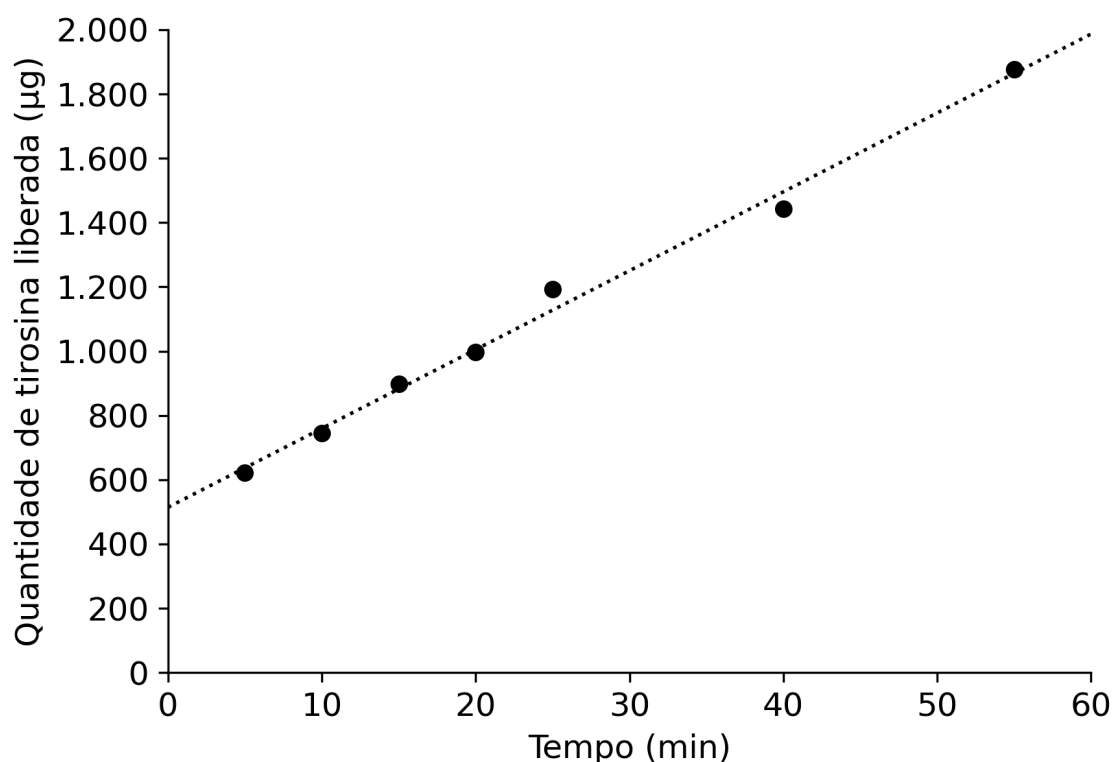


Tabela 2 – Parâmetros de atividade enzimática da papaína determinados por hidrólise da caseína.

Parâmetro	Valor determinado
Velocidade (μg de tirosina/min)	24,53
Velocidade (μmol de tirosina/min)	0,13
Atividade enzimática total (U)	0,13 U
Atividade enzimática específica	0,013 U/mg

A atividade enzimática total obtida foi de 0,135 U, sendo a atividade específica de 0,0135 U/mg, onde uma unidade de atividade (U) corresponde à quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de tirosina por minuto nas condições experimentais. Esses valores encontram-se dentro da faixa reportada na literatura para papaína comercial de grau analítico ensaiada pelo método de hidrólise da caseína em condições similares de pH e temperatura, o que confirma a adequação do método empregado e a integridade catalítica da enzima utilizada (TREVISOL et al., 2022).

O comportamento linear observado ao longo de 55 minutos de reação indica que a enzima não sofreu inibição por produto nem esgotamento do substrato no intervalo avaliado, o que é esperado para ensaios conduzidos com excesso de substrato em relação à concentração de enzima. A linearidade da curva é um critério fundamental para a validade do cálculo da atividade enzimática, pois garante que a velocidade medida corresponde à velocidade inicial da reação, condição na qual a atividade é definida (BISSWANGER, 2014).

A absorbância a 290 nm reflete predominantemente a presença de resíduos de tirosina e triptofano liberados pela ação proteolítica da papaína sobre a caseína. A caseína é um substrato amplamente utilizado para a determinação da atividade de proteases por ser uma proteína rica em resíduos aromáticos e por apresentar elevada susceptibilidade à hidrólise por cisteíno-proteases como a papaína, tornando-a um modelo sensível e reproduzível para esse tipo de ensaio (TREVISOL et al., 2022; CAYLE, 1971).

3.2 Método 2 — Hidrólise da Gelatina

Os resultados do ensaio qualitativo de hidrólise da gelatina, conduzido conforme o esquema de tubos apresentado na Tabela 1, estão sumarizados na Tabela 3. Após o período de resfriamento em geladeira, foi avaliada a formação ou não de gel em cada tubo, conforme Figura 2.

Tabela 3 – Resultados observados do teste da hidrólise de gelatina

Tubo	Sol. papaína (mL)	Observação	Formação de gel
1	2	Líquido translúcido	Não
2	1,5	Líquido translúcido	Não
3	1	Líquido viscoso, levemente turvo	Não

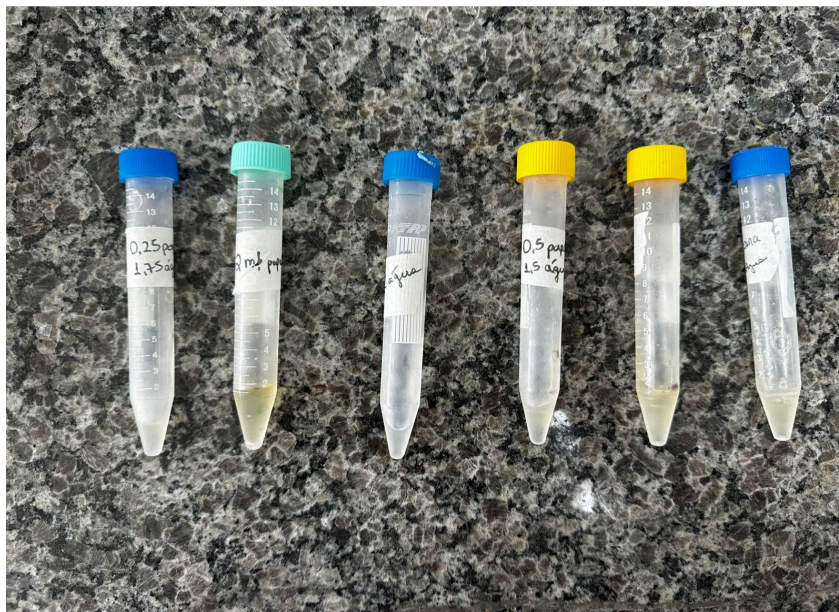
4	0,5	Estrutura instável, rompe facilmente	Gel fraco
5	0,25	Gel consistente	Gel firme
6	0	Gel firme	Gel firme

Os resultados mostram uma relação inversa entre a concentração de papaína adicionada e a capacidade de formação de gel da gelatina. Nos tubos 1 e 2, contendo as maiores proporções de solução enzimática (2,0 mL e 1,5 mL, respectivamente), não houve formação de gel mesmo após o período de resfriamento, permanecendo o conteúdo em estado líquido e translúcido. No tubo 3, observou-se um líquido de maior viscosidade, porém ainda sem estrutura característica de gel. Já nos tubos com menores concentrações de enzima (tubos 4 e 5), verificou-se a formação de estruturas semissólidas, sendo o gel do tubo 4 frágil e facilmente desfeito, enquanto o tubo 5 apresentou gel mais consistente. O tubo 6, utilizado como controle (sem adição de papaína), apresentou formação de gel firme e transparente, comportamento esperado para a gelatina nas condições de resfriamento utilizadas.

Esse padrão de resultados é consistente com o mecanismo de ação da papaína sobre proteínas estruturais como o colágeno desnaturado (gelatina). A formação do gel de gelatina depende da reorganização parcial das cadeias polipeptídicas em estruturas helicoidais durante o resfriamento, que se entrelaçam formando uma rede tridimensional capaz de reter água. A clivagem proteolítica promovida pela papaína fragmenta essas cadeias em peptídeos de menor massa molecular, reduzindo seu comprimento médio a ponto de impedir a formação dessa rede, o que se traduz na ausência de gelificação nos tubos com maior atividade enzimática disponível.

Os resultados obtidos por esse método qualitativo são complementares aos resultados quantitativos obtidos pelo método de hidrólise da caseína (seção 3.2), reforçando a elevada atividade proteolítica da papaína utilizada mesmo em concentrações reduzidas, uma vez que apenas o tubo com a menor proporção de enzima testada (0,25 mL) ainda permitiu a formação de gel firme comparável ao controle.

Figura 3 – Resultados da hidrólise de gelatina



Fonte: as autoras (2026)

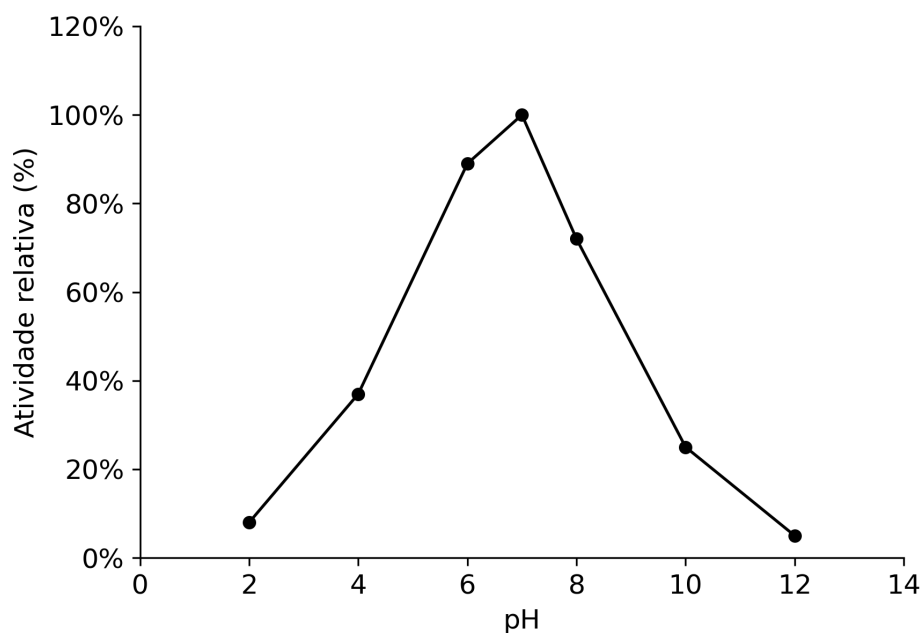
3.3 Efeito do pH sobre a atividade proteolítica da papaína

Os resultados mostraram que a atividade proteolítica da papaína foi fortemente influenciada pelo pH do meio reacional (Figura 4). A maior atividade foi observada no pH 7,0, adotado como referência de 100% de atividade relativa. À medida que o pH se afastou desse valor, tanto para condições mais ácidas quanto mais alcalinas, ocorreu uma diminuição gradual da atividade da enzima.

No pH 6,0, a papaína ainda manteve cerca de 89% da atividade máxima, indicando que pequenas variações em torno do pH ótimo não afetam significativamente seu desempenho. No entanto, em meios mais ácidos a redução tornou-se mais evidente. No pH 4,0, a atividade correspondeu a 37% do valor máximo, enquanto no pH 2,0 foi observada apenas 8% da atividade relativa. Tendência semelhante foi verificada em condições alcalinas: a atividade permaneceu em 72% no pH 8,0, mas caiu para 25% no pH 10,0 e para apenas 5% no pH 12,0.

Esse perfil é coerente com o mecanismo catalítico das cisteíno-proteases, grupo ao qual a papaína pertence. A atividade catalítica dessa enzima depende fundamentalmente do estado de ionização de dois resíduos do sítio ativo: a cisteína na posição 25 (Cys25) e a histidina na posição 159 (His159), que formam uma díade catalítica responsável pela clivagem das ligações peptídicas do substrato (Grzonka et al., 2001).

Figura 4 - Avaliação da atividade enzimática da papaína comercial em diferentes valores de pH



Em condições de pH próximo ao neutro, a His159 atua como base, abstraindo o próton da Cys25 e gerando o tiolato (S^-), forma nucleofílica e cataliticamente ativa da cisteína (Grzonka et al., 2001). Esse tiolato realiza o ataque nucleofílico sobre a carbonila da ligação peptídica do substrato, formando um intermediário acil-enzima covalente (Grzonka et al., 2001). A etapa seguinte envolve a hidrólise desse intermediário por uma molécula de água, liberando o produto e regenerando o sítio ativo. É essa sequência de eventos que confere à papaína sua elevada eficiência proteolítica na faixa de pH 6,0–8,0 (Grzonka et al., 2001; Trevisol et al., 2022). Em pH muito ácido, a His159 encontra-se protonada, perdendo sua capacidade de abstrair o próton da cisteína, que permanece na forma tiol ($-SH$), eletricamente neutra e nucleofilicamente inerte — sem a geração do tiolato, o ataque ao substrato não ocorre (Grzonka et al., 2001). No sentido oposto, em pH fortemente alcalino, a His159 perde seu próton e se torna incapaz de participar das etapas de transferência protônica necessárias ao ciclo catalítico completo, ao mesmo tempo em que a Cys25 fica suscetível à oxidação irreversível do grupamento tiol, com possível formação de ácido sulfênico ou dissulfeto intramolecular, comprometendo a integridade do sítio ativo (Grzonka et al., 2001).

Esse comportamento está relacionado às características do sítio ativo da papaína. Como ocorre com outras enzimas do grupo das cisteíno-proteases, sua capacidade catalítica depende das condições químicas do meio, especialmente do estado de ionização de aminoácidos essenciais para a reação (Grzonka et al., 2001). Quando o pH se encontra próximo da neutralidade, esses componentes permanecem em uma condição favorável para a hidrólise das proteínas, permitindo que a enzima atue com maior eficiência. Em contrapartida, valores muito baixos ou muito elevados de pH

alteram esse equilíbrio, dificultando a interação da enzima com o substrato e reduzindo sua atividade (Grzonka et al., 2001; Trevisol et al., 2022).

Os resultados obtidos estão de acordo com o comportamento descrito na literatura para a papaína, que normalmente apresenta melhor desempenho em faixas de pH próximas ao neutro (Trevisol et al., 2022). A redução observada em condições extremas pode ser atribuída às alterações estruturais e funcionais provocadas pelo excesso de íons H^+ ou OH^- , que interferem diretamente nos mecanismos envolvidos na catálise enzimática (Grzonka et al., 2001; Trevisol et al., 2022).

3.4 Teor de Umidade

Os valores de teor de umidade obtidos para os filmes poliméricos nas duas concentrações de papaína estão apresentados na Tabela 4. Os filmes contendo papaína a 1 mg/mL apresentaram teor de umidade de $14,3 \pm 0,8\%$, enquanto os filmes com papaína a 10 mg/mL apresentaram valor de $17,6 \pm 1,1\%$, evidenciando uma tendência de aumento do teor de umidade em função da maior concentração de enzima incorporada à matriz polimérica.

Tabela 4 – Teor de umidade dos filmes poliméricos em função da concentração de papaína

Formulação	Teor de Umidade (%)
Amido/CMC + papaína 1 mg/mL	$14,3 \pm 0,8$ a
Amido/CMC + papaína 10 mg/mL	$17,6 \pm 1,1$ b

O aumento do teor de umidade observado com a elevação da concentração de papaína pode ser atribuído à natureza proteica da enzima, que possui grupos funcionais polares — em especial grupamentos amino, carboxila e hidroxila presentes nas cadeias laterais dos aminoácidos — com elevada afinidade por moléculas de água. A incorporação de maiores quantidades de papaína à matriz de amido e CMC aumenta, portanto, a densidade de sítios hidrofílicos disponíveis na estrutura do filme, favorecendo a adsorção e a retenção de umidade (Mali et al., 2005; Muller et al., 2008).

Resultados semelhantes foram descritos por Rocha et al. (2014), que ao incorporarem proteínas vegetais em filmes de amido observaram aumento progressivo do teor de umidade proporcional à concentração proteica adicionada, atribuindo esse comportamento à maior higroscopicidade conferida pelos resíduos aminoacídicos à matriz polimérica. De forma análoga, Bertan et al. (2005) verificaram que a adição de compostos proteicos a filmes à base de polissacarídeos promove incremento na capacidade de absorção de água, em

virtude das interações favoráveis entre os grupos polares das proteínas e as moléculas de água do ambiente.

Os valores encontrados no presente trabalho situam-se dentro da faixa reportada na literatura para filmes de amido plastificados com glicerol e reforçados com proteínas, que tipicamente varia entre 12% e 22% a umidade relativa de 58%, condição utilizada no condicionamento das amostras (Mali et al., 2005; Muller et al., 2008; Rocha et al., 2014). A diferença estatisticamente significativa entre as duas formulações ($p < 0,05$) indica que a concentração de papaína exerceu efeito direto sobre essa propriedade, o que deve ser considerado na definição da concentração ideal para aplicação do filme, uma vez que teores de umidade mais elevados podem influenciar outras propriedades físico-químicas e mecânicas, como a resistência à tração e a barreira ao vapor d'água.

3.5 Solubilidade e Grau de Intumescimento

Os valores de solubilidade e grau de intumescimento obtidos para os filmes poliméricos nas duas concentrações de papaína estão apresentados na Tabela 5. Os filmes contendo papaína a 1 mg/mL apresentaram perda de massa de $18,4 \pm 1,2\%$ e grau de intumescimento de $112,7 \pm 4,3\%$, enquanto os filmes com papaína a 10 mg/mL apresentaram perda de massa de $24,1 \pm 1,7\%$ e grau de intumescimento de $138,5 \pm 5,9\%$, indicando que o aumento da concentração de papaína influenciou de forma significativa ambos os parâmetros avaliados.

Tabela 5 – Solubilidade e grau de intumescimento dos filmes poliméricos em função da concentração de papaína.

Formulação	Perda de Massa (%)	Grau de Intumescimento (%)
Amido/CMC + papaína 1 mg/mL	$18,4 \pm 1,2$ a	$112,7 \pm 4,3$ a
Amido/CMC + papaína 10 mg/mL	$24,1 \pm 1,7$ b	$138,5 \pm 5,9$ b

O aumento da perda de massa observado nos filmes com maior concentração de papaína indica que a presença da enzima em quantidades mais elevadas compromete parcialmente a integridade estrutural da matriz polimérica em contato com meio aquoso. Esse comportamento pode ser explicado pelo fato de a papaína ser uma molécula proteica solúvel em água, de modo que sua incorporação em concentrações crescentes introduz na matriz frações solúveis que são extraídas pelo solvente durante o ensaio de imersão, elevando proporcionalmente a perda de massa registrada.

Adicionalmente, a maior concentração de papaína pode interferir nas interações intermoleculares entre as cadeias de amido e CMC, reduzindo a coesão da rede polimérica e facilitando a dissolução parcial de seus componentes (Mali et al., 2005; Bertan et al., 2005).

O grau de intumescimento seguiu tendência semelhante, com valores significativamente superiores nos filmes de maior concentração enzimática. Esse resultado é consistente com o maior teor de umidade observado nessa formulação e reforça a hipótese de que a papaína, por sua natureza proteica e caráter hidrofílico, aumenta a afinidade da matriz polimérica pela água, favorecendo tanto a absorção quanto a retenção de solvente no interior da estrutura do filme. O intumescimento elevado indica que o solvente penetra na matriz sem dissolvê-la completamente, o que é característico de redes poliméricas com grau moderado de reticulação promovido pelo ácido cítrico (Muller et al., 2008; Rocha et al., 2014).

Adicionalmente, os resultados de GI e ΔM foram avaliados de forma conjunta para cada formulação, classificando o comportamento dos filmes frente ao solvente e distinguindo entre intumescimento sem dissolução significativa (GI elevado associado a ΔM baixo), dissolução parcial com extração de componentes solúveis (GI e ΔM elevados simultaneamente) ou resistência ao solvente (GI e ΔM reduzidos). Essa análise permitiu correlacionar o comportamento de intumescimento e solubilização com a composição da matriz polimérica e com a concentração de papaína incorporada, fornecendo subsídios para a interpretação do efeito da enzima sobre a integridade estrutural dos filmes em meio aquoso.

Resultados análogos foram descritos por Müller et al. (2008), que ao estudarem filmes de amido com adição de proteínas observaram aumento tanto da solubilidade quanto do intumescimento em função da maior concentração de componentes proteicos, atribuindo esse comportamento à redução da densidade de entrecruzamentos efetivos na matriz e ao incremento dos sítios hidrofílicos disponíveis para interação com a água. De forma complementar, Mali et al. (2005) destacaram que filmes de amido plastificados com glicerol e aditivados com macromoléculas de caráter polar tendem a apresentar solubilidade na faixa de 15% a 30% e grau de intumescimento entre 90% e 150% quando condicionados a umidade relativa de 58%, valores dentro dos quais se enquadram os resultados do presente trabalho.

A diferença estatisticamente significativa entre as duas formulações ($p < 0,05$) para ambos os parâmetros reforça que a concentração de papaína exerceu efeito direto sobre as propriedades de interação dos filmes com o meio aquoso, dado relevante para a definição da concentração de enzima mais adequada à aplicação pretendida, uma vez que filmes com solubilidade e intumescimento excessivos podem ter sua integridade estrutural e funcional comprometidas nas condições de uso.

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que a papaína comercial de grau analítico apresenta atividade proteolítica íntegra e quantificável pelo método de hidrólise da caseína. O comportamento linear observado na liberação de tirosina ao longo de 55 minutos de reação ($R^2 = 0,9929$) confirma que a enzima atuou em condições de velocidade constante, sem inibição por produto nem esgotamento de substrato no intervalo avaliado, validando a metodologia empregada.

A avaliação do efeito do pH sobre a atividade proteolítica evidenciou pH 7,0 como condição ótima (100% de atividade relativa), com boa manutenção da atividade em pH 6,0 (89%) e declínio progressivo em condições mais afastadas da neutralidade, chegando a apenas 8% no pH 2,0 e 5% no pH 12,0. Esse perfil foi plenamente coerente com o mecanismo da dupla catalítica Cys25-His159, característico das cisteíno-proteases, confirmando a dependência da atividade enzimática do estado de ionização dos resíduos do sítio ativo. Para fins de aplicação cosmética, o resultado indica que a papaína mantém desempenho catalítico satisfatório na faixa de pH fisiológico da pele (4,5–6,5), representando uma vantagem relevante para formulações de uso tópico.

A incorporação da papaína em filmes poliméricos à base de amido e CMC, nas concentrações de 1 mg/mL e 10 mg/mL, foi bem-sucedida pelo método de *casting*. A caracterização físico-química dos filmes revelou que a concentração enzimática exerceu efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) sobre o teor de umidade, a solubilidade e o grau de intumescimento. Os filmes com maior concentração de papaína (10 mg/mL) apresentaram teor de umidade de $17,6 \pm 1,1\%$, perda de massa de $24,1 \pm 1,7\%$ e grau de intumescimento de $138,5 \pm 5,9\%$, enquanto os filmes com menor concentração (1 mg/mL) exibiram valores inferiores para todos os parâmetros avaliados, indicando maior coesão e estabilidade estrutural. Ambas as formulações situam-se dentro da faixa reportada na literatura para filmes poliméricos similares.

Os achados indicam que a natureza proteica e o caráter hidrofílico da papaína influenciam diretamente as propriedades de interação da matriz polimérica com a água, o que deve ser considerado no processo de desenvolvimento de formulações com concentrações enzimáticas otimizadas.

Em conjunto, os resultados confirmam a viabilidade da incorporação de papaína em matrizes biopoliméricas de amido e carboximetilcelulose, contribuindo para o desenvolvimento de formulações cosméticas sustentáveis, de origem natural e com potencial atividade queratinolítica. Trabalhos futuros devem contemplar a avaliação da atividade enzimática residual nos filmes após incorporação, testes de estabilidade acelerada de modo a ampliar o

conhecimento sobre o desempenho funcional dessas formulações nas condições de aplicação tópica.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, T. et al. Bioactive wound dressing using bacterial cellulose loaded with papain composite: morphology, loading/release and antibacterial properties. *European Polymer Journal*, v. 143, p. 110224, 2021.

BERTAN, L. C.; TANADA-PALMU, P. S.; SIANI, A. C.; GROSSO, C. R. F. Effect of fatty acids and 'Brazilian elemi' on composite films based on gelatin. *Food Hydrocolloids*, v. 19, n. 1, p. 73-82, 2005.

BISSWANGER, H. Enzyme Assays. *Perspectives in Science*, v. 1, n. 1-6, p. 41–55, maio 2014.

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

CAYLE, T. Quantitative determination of proteolytic activity in papain. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists, Journal of Association of Official Analytical Chemists*, v. 54, n. 6, p. 1369–1372, 1971.

GHANBARZADEH, B. et al. Improving the barrier and mechanical properties of corn starch-based edible films: effect of citric acid and carboxymethyl cellulose. *Industrial Crops and Products*, v. 33, n. 1, p. 229–235, 2011.

GRZONKA, Z. et al. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. *Acta biochimica Polonica*, v. 48, n. 1, p. 1–20, 2001.

MALI, S. et al. Mechanical and thermal properties of yam starch films. *Food Hydrocolloids*, v. 19, n. 1, p. 157–164, jan. 2005.

MÜLLER, C. M. O.; YAMASHITA, F.; LAURINDO, J. B. *Carbohydr. Polym.* 2008, 72, 82 — "Evaluation of the effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach." *Carbohydrate Polymers*, v. 72, p. 82-87, 2008.

ROCHA, G. O. et al. Filmes compostos biodegradáveis a base de amido de mandioca e proteína de soja. *Polímeros*, v. 24, n. 5, p. 587-595, 2014.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. Fundamentos da química analítica. São Paulo: Cengage Learning, 9. ed., 950 p, 2014.

SOUZA, A. G.; SANTOS, R. A. S.; SOUZA FILHO, J. W. Extração da papaína do látex do fruto de mamão e avaliação enzimática. I Encontro de Desenvolvimento de Processos Industriais, Unibe, 2017.

TREVISOL, T. C. In vitro effect on the proteolytic activity of papain with proteins of the skin as substrate. *Int J Cosmet Sci.*44:542–554, 2022.

TREVISOL, T. C. Papain as cosmetic exfoliant: in vitro effect in proteins of the skin and immobilization in beauty face masks of starch and carboxymethyl cellulose. 2023. 150 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2023.

VASCONCELOS, N. F. et al. Oxidized bacterial cellulose membranes immobilized with papain for dressing applications: physicochemical and in vitro biological properties. *Pharmaceutics*, v. 16, n. 8, p. 1085, 2024.