

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

ITALO ROSSANO DIVÉRIO DE ROSSO

**PERFIL PROTEICO DO MÚSCULO SEMITENDINOSO DE ORIGEM BOVINA
SOB EFEITO DO PRINCÍPIO ATIVO "PAPAÍNA"**

São Gabriel

2014

ITALO ROSSANO DIVÉRIO DE ROSSO

**PERFIL PROTEICO DO MÚSCULO SEMITENDINOSO DE ORIGEM BOVINA
SOB EFEITO DO PRINCÍPIO ATIVO "PAPAÍNA"**

Trabalho de Conclusão do Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA, como requisito parcial para obtenção de Título em Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Luis Fabiano Santos da Costa

São Gabriel

2014

ITALO ROSSANO DIVÉRIO DE ROSSO

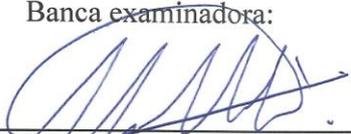
**PERFIL PROTEICO DO MÚSCULO SEMITENDINOSO DE ORIGEM BOVINA
SOB EFEITO DO PRINCÍPIO ATIVO "PAPAÍNA":**

Trabalho de Conclusão do Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA, como requisito parcial para obtenção de Título em Bacharel em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia
(Proteômica).

TCC defendido e aprovado em: 21 de agosto de 2014

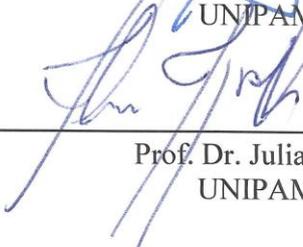
Banca examinadora:



Prof. Dr. Luis Fabiano Santos da Costa
Orientador
UNIPAMPA



Prof. Dr. Paulo Marcos Pinto
UNIPAMPA



Prof. Dr. Juliano Boldo
UNIPAMPA

AGRADECIMENTO

Ao Prof. Dr. Luis Fabiano Santos da Costa, que apoiou e colaborou em todo o processo de produção e também minha gratidão pela forma de conduzir o curso em todas as suas etapas.

Ao Prof. Dr. Paulo Marcos Pinto, pelo apoio, ajuda e colaboração na parte experimental deste trabalho.

A todos os colegas de curso pelo convívio e pelos momentos de amizade em especial aos colegas Felipe Ferreira Guimarães, Matheus Dias, Aline Weyh e João Hélio Jaques que ajudaram na parte experimental e da pesquisa.

A mestrande Evelise Leis Carvalho, pelo apoio e ajuda na parte experimental.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta pesquisa.

RESUMO

Para a matriz de qualidade da carne bovina, a maciez assume posição de destaque sendo considerada a característica organoléptica de maior influência na aceitação da carne por parte dos consumidores. Destacando como influencia na maciez da carne, podemos citar a genética, a raça, a idade ao abate, o sexo, a alimentação, o uso de agentes hormonais e os tratamentos *post-mortem*. O aumento da população mundial e conseqüentemente o maior consumo de alimentos, nos leva a buscar alternativas biotecnológicas para suprir essas necessidades de alcançar índices de alimentos em relação ao crescimento populacional, o que justifica a procura de alternativas para alcançar carnes mais macias. O mercado tem desenvolvido produtos com princípio ativo de alguns vegetais como, por exemplo, a papaína. Estudos sobre a ciência da carne estão sendo realizados para avançar na seleção de animais que atendam com qualidade os consumidores. O objetivo desse estudo foi analisar o perfil proteico da ação da papaína sobre amostras de carne via SDS-PAGE usando concentrações específicas, tempos pré-determinados e duas variações de temperaturas, assim como comparar diferentes tempos de exposição, bem como avaliar o efeito do princípio ativo em diferentes temperaturas e, por fim, relacionar as diferentes concentrações com o tempo de exposição do princípio ativo. A metodologia utilizada foi através de análise eletroforética em gel de poliacrilamida de amostras de músculo submetidas ao tratamento com o princípio ativo papaína em concentrações específicas de 0,10%, 0,25% e 0,50%, e tempos predeterminados de 5, 10 e 15 minutos de tratamento e duas variações de temperatura (20°C e 65°C). Para a análise via SDS-PAGE, foram adquiridas amostras de músculo semitendinoso da espécie *Bos taurus taurus*, região conhecida como tatu ou lagarto, considerada uma peça de carne nobre de característica rígida no comércio local no município de São Gabriel - RS no período de julho de 2014. As amostras tiveram pesos padronizados em 0,5g e foram realizadas em duplicata. Os complexos de proteínas ou proteínas de maior massa molecular sofreram maior ação da papaína, assim como na temperatura de 65°C houve maior potencialização do composto sobre a amostra, e na verificação dos tempos de exposição do composto, não houve atividade considerável, ou muito baixa entre os tempos estabelecidos. Concluímos que o princípio ativo da papaína sobre o músculo semitendinoso de *Bos taurus taurus* tem sua ação efetivada a temperatura de 65°C, e na concentração de 5%, e no fator tempo não houve uma diferença significativa entre os resultados encontrados.

Palavras-chave: Carne, Maciez, Atividade Proteolítica.

ABSTRACT

To the matrix of meat quality, softness assumes a prominent position and is considered the most influential organoleptic characteristic for the acceptance by beef consumers. To highlight how meat tenderness is influenced, we can cite the genetics, breed, age of slaughter, sex, nutrition, use of hormonal agents and *post-mortem* treatments. The increasing world population and food consumption lead us to seek biotechnological alternatives to address these needs to achieve rates of food in relation to population growth, which justifies the search for alternatives to achieve a more tender meat. The market has developed products with active principle from vegetables such as papain. Scientific studies about the meat are being made to improve the selection of animals so that they can meet the desired quality by consumers. The goal of this study was to analyze the protein profile of the action of papain on samples of meat through SDS-PAGE using specific concentrations, predetermined times and two variations of temperatures, as well as to compare different periods of exposure and assess the effect of the active principle in different temperatures and, lastly, relate the different concentrations with the period of exposure of the active principle. The methodology used was polyacrylamide electrophoresis analysis of muscle samples subjected to treatment with the active principle papain in the specific concentrations of 0,1%, 0,25% and 0,50%, and predetermined times of 5, 10 and 15 minutes and two variations of temperatures (20°C and 65°C). For the SDS-PAGE analysis, samples of the posterior semitendinosus muscle region (also known regionally as *tatu* or *lagarto*), which is considered a noble piece of rigid characteristic, were purchased from the local market in the city of São Gabriel - RS in July 2014. The samples had their weights standardized in 0,5g and were made in duplicate. The protein complexes or protein of higher molecular mass suffered more action of papain, as the temperature of 65°C had a greater potentialization of the compound on the sample and in the checking of the exposure time of the compound, there hasn't been found considerable activity, or it is too low between the established times. We conclude that the active principle of papain on the semitendinosus muscle from *Bos taurus* has its action effective at the temperature of 65°C in the concentration of 5%, and the time factor didn't show significant difference between the results found.

Keywords: Meat, Tenderness, Proteolytic Activity.

LISTA DE FIGURAS

Quadro 1	Concentração, tempo de exposição e temperatura das amostras.....	18
Quadro 2	Composição do Gel de Poliacrilamida.....	19
Quadro 3	Identificação das amostras para os géis 1 e 2 de poliacrilamida.....	20
Quadro 4	Identificação das amostras para o gel 3 de poliacrilamida.....	20
Figura 1	Análise eletroforética em placa de gel de poliacrilamida com SDS, com M = marcadores moleculares, Controles T.A. (temperatura ambiente) e 65°C. Concentração de Papaína de 1%, 2,5% e 5%. Tempos de exposição 5', 10' e 15 minutos.....	22
Figura 2	Gel de poliacrilamida, com M = marcadores moleculares, Controles T.A. (temperatura ambiente). Concentração de Papaína de 1%, 2,5% e 5%. Tempos de exposição 5' minutos.....	23
Figura 3	Gel de poliacrilamida, com M = marcadores moleculares, Controles 65°C. Concentração de Papaína de 1%, 2,5% e 5%. Tempos de exposição 5' minutos.....	24
Figura 4	Gel de poliacrilamida, com M = marcadores moleculares, controle a temperatura ambiente. Concentração de Papaína de 1%, 2,5% e 5%. Tempos de exposição 10' minutos.....	25
Figura 5	Gel de poliacrilamida, com M = marcadores moleculares, controle a 65°C. Concentração de Papaína de 1%, 2,5% e 5%. Tempos de exposição 10' minutos.....	26
Figura 6	Gel de poliacrilamida, com M = marcadores moleculares, controle a temperatura ambiente. Concentração de Papaína de 1%, 2,5% e 5%. Tempos de exposição 15' minutos.....	27
Figura 7	Gel de poliacrilamida, com M = marcadores moleculares, controle a temperatura de 65°C. Concentração de Papaína de 1%, 2,5% e 5%. Tempos de exposição 15' minutos.....	28
Figura 8	Análise eletroforética em placa de gel de poliacrilamida com SDS, com M = marcadores moleculares, Controles T.A. (temperatura ambiente) e 65°C. Concentração de Papaína de 1%, 2,5% e 5%. Tempo de exposição 10' minutos.....	29
Figura 9	Gel de poliacrilamida, com M = marcadores moleculares, controle a temperatura ambiente. Concentração de Papaína de 1%, 2,5% e 5%. Tempo de exposição 10' minutos.....	30
Figura 10	Gel de poliacrilamida, com M = marcadores moleculares, controle a temperatura de 65°C. Concentração de Papaína de 1%, 2,5% e 5%. Tempo de exposição 10' minutos.....	31

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	09
2	DESENVOLVIMENTO.....	11
2.1	Perspectiva da carne bovina no mundo.....	11
2.2	Maciez.....	12
2.3	Papaína.....	13
2.4	Aplicações da Papaína.....	15
2.5	Objetivo geral.....	17
2.6	Objetivo específico.....	17
2.7	Material e Métodos.....	18
2.7.1	Amostra.....	18
2.7.2	Maceração das amostras.....	19
2.7.3	Centrifugação.....	19
2.7.4	Separação de Proteínas por SDS-PAGE	19
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	33
	REFERÊNCIAS.....	34

1 INTRODUÇÃO

Um dos grandes problemas que a população do nosso planeta sofre, é, sem dúvida, a má distribuição de renda e conseqüentemente, pessoas menos abonadas tem uma baixa qualidade de vida, outro e não menos importante problema e a superpopulação, que juntamente com matérias primas escassas formam o conjunto de ações do mercado, que é a oferta e procura, quando um produto tem muita procura e pouca oferta seu preço sobe, assim como um produto que tem baixa procura e muita oferta seu preço baixa. Se pensarmos nesta questão em relação à alimentação e mais especificamente na carne bovina, podemos observar que a produção não vai atender a toda a demanda, por esse motivo busca-se desenvolver alternativas biotecnológicas para que a demanda seja atendida. Uma das alternativas é de aumentar a qualidade das características organoléptica, como uma delas pode destacar a maciez.

Alternativas do uso de plantas com o principio ativo na produção de substancias que possam gerar alguma característica organoléptica favorável, assim podemos destacar o látex do fruto verde do *Carica papaya Linne*, o mamão papaia que gera a Papaína que produz endopeptidases para o seu metabolismo proteico, gerando uma maciez na carne pela quebra de proteínas. Sendo utilizada sobre a carne ela realiza ligações com um grupo sulfidril livre e assim tem sua ação catalítica ativada por adição de um agente redutor ou aumento da temperatura, realizando assim a quebra dessas ligações.

Através de atividades biotecnológicas pode-se analisar a ação da papaína sobre as amostras de carne através da metodologia de SDS-PAGE. Para a análise do principio ativo, foram usadas concentrações específicas, tempos predeterminados e duas variações de temperaturas (a temperatura ambiente 20°C e a temperatura aquecida em 65°C). As amostras são do músculo semitendinoso da espécie *Bos taurus taurus*, região posterior (corte chamado de lagarto ou tatu), que tem características organoléptica de boa qualidade e foram adquiridos no comercio local no município de São Gabriel - RS no período de julho de 2014, as amostras tiveram seu peso padronizados e foram realizadas em duplicatas, para a quebra e separação da partes componentes da célula foi utilizado nitrogênio liquido na maceração das amostras, assim como a utilização de agentes estabilizadores das proteínas durante a centrifugação, para a marcação das proteínas no gel foi utilizado corante específico para proteínas e entre as ações as amostra eram acondicionadas em freezer, para a integridade das mesmas. Podendo assim analisar o efeito da papaína sobre músculo semitendinoso de *Bos*

taurus taurus, e comparar diferentes tempos de exposição do princípio ativo com a amostra, bem com avaliar o efeito do princípio ativo em diferentes tempos e assim relacionar as diferentes concentrações com o tempo de exposição do princípio ativo.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Perspectiva da carne bovina no mundo.

Dados da FARSUL (2012) indicam que os principais produtores de carne bovina são Estados Unidos, Brasil e União Europeia, que juntos detêm praticamente 50% do *market share* mundial, sendo que destes, apenas o Brasil apresentou crescimento.

O Brasil é o segundo maior produtor de Carne Bovina no mundo, com 9,38 milhões de toneladas, o segundo maior consumidor mundial com 7,99 milhões de toneladas e o segundo maior exportador de carne bovina com 1,45 milhões de toneladas; detendo *market share* de 16,3% na produção, 14,4% no consumo e 16,2% nas exportações mundiais (FARSUL, 2012).

A produção brasileira de carne bovina apresentou redução de 2,8% em 2011 frente a 2010, para 2012, segundo os dados do IBGE (2012), houve crescimento de 5,54%, face ao ano anterior, sendo esta situação repetida para 2013 devido a forte demanda e aos preços atrativos no mercado internacional.

A produção brasileira de 2013 teve um aumento de 2%, segundo dados do USDA (2013), sendo que em 2012 o País produziu 9,21 milhões de toneladas e em 2013 estima-se 9,38 milhões de toneladas.

Para FARSUL (2012) o mercado brasileiro absorve, praticamente, toda a produção de carne bovina, detendo 85%, sendo o restante, 15% destinado à exportação. O alto percentual de destinado ao mercado interno reflete-se no consumo, que em 2013 foi de 7,99 milhões de toneladas, representando 1,4% de crescimento, em relação a 2012, quando se produzia 7,88 milhões de toneladas.

A exportação brasileira de carne bovina reflete o cenário positivo do mercado internacional, com os preços e a forte demanda pelo produto brasileiro, além das taxas de câmbio e problemas enfrentados pelos países concorrentes. Nos últimos anos o País mantém-se exportando 1 bilhão de toneladas de carne bovina.

A partir da consolidação da posição brasileira do mercado de carne bovina no Brasil através da sua produção e exportação, como indica a FARSUL (2012), o Rio Grande do Sul segue a mesma tendência, o mercado de carne bovina deve ser puxado no curto e no médio prazo pelo consumidor doméstico – forte demanda pelo produto do Rio Grande do Sul.

2.2 Maciez

Classifica-se a dureza da carne em pelo menos dois componentes a dureza residual, causada pelo tecido conjuntivo (colágeno, elastina) e outras proteínas do estroma e a dureza de actomiosina, causada pelas proteínas miofibrilares. Essa divisão poderia explicar resultados conflitantes encontrados na literatura sobre variações de maciez ou dureza da carne e também porque certos trabalhos mostraram correlação entre quantidade de tecido conjuntivo e dureza, enquanto outros não encontraram correlação, pois os tecidos conjuntivos contribuem com apenas um dos dois fatores responsáveis pela dureza. Consequentemente, naqueles músculos (ou animais) em que o teor de tecido conjuntivo é alto, este irá contribuir com maior parcela para a dureza total, e a quantidade de tecido conjuntivo estará positivamente correlacionada com a dureza, ou negativamente correlacionada com a maciez. Já nos tecidos ou animais em que o tecido conjuntivo é baixo ou a dureza de actomiosina é elevada, não haverá boa correlação entre dureza e teor de tecido conjuntivo (SGARBIERI, 1996).

A maciez da carne pode ser medida por meio subjetivo ou objetivo. O método subjetivo se utiliza de painel sensorial em que um grupo de pessoas treinadas classifica a carne em relação à maciez após ter provado as amostras, atribuindo à percepção sensorial (paladar), como: resistência à língua, à pressão do dente, aderência e resíduo pós-mastigatório, ou seja, uma miríade de fatores fortemente subjetivos (BELCHER et al. 2007; MUCHENJE et al. 2009). O método objetivo utiliza equipamento, como o texturômetro, que mede a força necessária para o cisalhamento de uma seção transversal de carne e, quanto maior a força dispensada, menor é a maciez apresentada pelo corte de carne (ALVES et al. 2005; RAMOS; GOMIDE, 2007).

Dentre os fatores que influenciam a maciez da carne, destacam-se: genética, raça, idade ao abate, sexo, alimentação, uso de agentes hormonais e tratamentos *post-mortem*.

MONSON et al. (2005) argumentaram que a maciez da carne está relacionado com o conteúdo de colágeno, a estabilidade térmica e da estrutura miofibrilar do músculo. Estes, no entanto, parecem ser afetados principalmente pelo crescimento do animal em detrimento à raça, somente.

O tecido conjuntivo dentro do músculo é incrivelmente variável, dependendo do estágio de desenvolvimento do animal, posição do músculo e sua função, raça do animal, nutrição, exercícios e lesões musculares (PURSLOW et al. 2005). Com a idade, ocorre o aparecimento das ligações cruzadas intra e intermoleculares do colágeno, que se tornam estáveis, de difícil desnaturação e, portanto, dificultando a digestão enzimática ou tratamentos

térmicos (MALTIN et al. 2003; PURSLOW et al. 2005; BIANCHINI et al. 2007; KUSS et al. 2010).

A influência da alimentação na maciez da carne está associada principalmente com o grau de acabamento (espessura de gordura subcutânea) e com o teor de gordura intramuscular na carcaça (MALTIN et al. 2003; PACHECO et al. 2005; ANDERSEN et al. 2005; BRONDANI et al. 2006;).

Todavia, os estoques de glicogênio muscular também podem sofrer influencia do sistema de alimentação e influenciar a maciez da carne via pH final (ROSENVOLD et al. 2001; LEHESKA et al. 2002).

O sexo influencia a composição do ganho em peso e a composição da carcaça e, por conseguinte, a maciez da carne. Animais de sexos diferentes chegarão ao ponto de abate (mesmo grau de acabamento da carcaça) em pesos ou idades diferentes (ALVES et al. 2005).

Poucos são os trabalhos que mostram não existir diferença na maciez da carne de animais inteiros e castrados. Animais não castrados crescem mais rapidamente e utilizam o alimento mais eficiente em uma mesma idade ou mesmo/peso, produzindo carcaça com mais músculo e menos gordura que animais castrados (VAZ et al., 2000; COSTA et al. 2007).

Existem ainda diversos procedimentos tecnológicos que são aplicados às carcaças e às carnes procurando, direta ou indiretamente, atuar sobre a maciez final. Por exemplo, a aplicação de sais de cálcio na carne para facilitar a ação das enzimas proteolíticas, que são cálcio-dependentes (MALTIN et al. 2003). O uso de propionato de cálcio e cloreto de cálcio promoveram melhorias significativas na maciez da carne de bovinos (HEINEMANN; PINTO, 2003; PEDREIRA et al. 2003).

Há muito tempo, os nativos de países tropicais amaciavam suas carnes deixando-as de molho no suco da fruta *Carica papaya*, esfregando-as com pedaços da fruta verde ou as embrulhando nas folhas do mamoeiro por uma noite antes da cocção.

2.3 Papaína

A Papaína pode provir de plantas que em geral produzem endopeptidase para o seu metabolismo proteico, como o látex do fruto verde de *Carica papaya Linne* que contém cisteína endopeptidases, como a papaína, as quimopapaínas A e B, a endopeptidase papaia III, a endopeptidase papaia IV e, acredita-se que, outra designada como endopeptidase Ω (MORAES; TERMIGNONI; SALAS, 1994).

O fruto é intensamente cultivado nas regiões do trópico e subtropical, por ser comestível e por ter enzimas estocadas em seus veios de látex, que estão dispostos em todas as partes aéreas da planta, podendo ser liberado facilmente através de pequenos danos às folhas da planta do papaia (ROTH; CLAUNSITZER, 1972).

Por ser um fluido tixotrópico o látex do papaia, com uma aparência leitosa, que contém cerca de 15% de matéria seca, 40% dessa matéria é constituída por enzimas, principalmente cisteínas endopeptidases que somadas, correspondem a mais de 80% da fração total de enzimas (AZARKAN et al., 2003), sendo as endopeptidases do papaia 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).

A papaína, correspondendo uma pequena quantidade constituinte (cerca de 8%) dentre as endopeptidases do mamão, foi a mais facilmente purificada. Culminando com importantes estudos sobre grupos tióis e na ação enzimáticas, também possibilitou o desenvolvimento do conhecimento a respeito da especificidade das proteinases (MITCHEL; CHAIKEN; SMITH, 1970).

A cristalização da Papaína foi a partir do látex fresco por Balls, Lineweaver e Thompson, em 1937. Sendo este processo melhorado, em escala preparativa, por Balls e Lineweaver (1939). Carnicina foi o primeiro nome do princípio ativo proveniente do látex das folhas e frutos do mamão verde adulto do *Carica papaya* Linne (família Caricaceae), em 1876, Peckolt isolou esse princípio ativo e o denominou de “papaiotina”. Entretanto, coube a Wutz, em 1880, denominaram “papaína” (HWANG; IVY, 1951; KLASSEN, 2000; MONETTA, 1987).

Através do processo descrito por Balls e Lineweaver (1939) os pesquisadores Kimmel e Smith (1957) obtiveram a papaína cristalina do látex seco, de forma rápida e econômica, em bom nível de pureza. Algumas outras propriedades da papaína foram determinadas, como a baixa massa molecular (KDa = 23,406) e a baixa estabilidade enzimática, sob condições extremas, que permitiram, em 1970, caracterizá-la cinética e estruturalmente. Por ser um tiol proteinase constituído de uma única cadeia polipeptídica contendo 212 resíduos de aminoácidos, e um ponto isoelétrico de 9,5 (SANGEETHA; ABRAHAM, 2006).

Por consistir em uma cadeia polipeptídica simples, Light et al. (1964, *apud* ARNON, 1970) foram os primeiros descrever a sequência de aminoácidos dessa enzima, indicando a da posição das ligações dissulfetos na molécula, bem como do grupo sulfidríla ativo. Através da estrutura cristalina tridimensional da papaína indica-se 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 (FERHST, 1980; KAMPHUIS et al., 1984; NAEEM; FATIMA; KHAN, 2006).

Com ligações de dissulfeto a conformação estrutural da papaína é estabilizada, uma vez destruída, 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.

Por fazer parte da classe das cisteínas, formam uma ligação covalente tioéster entre um grupamento acila do substrato e o grupamento sulfidrílico de um resíduo específico de cisteína, em seu sítio ativo (LEHNINGER, 2000). Para a ação catalítica a papaína requer um grupo sulfidril livre. A ativação pode ser conseguida com a adição de um agente redutor como a cisteína, sulfitos, ciamida, cianeto de hidrogênio, glutathione reduzida e tioglicolato. A inativação dessa proteína, por sua vez, pode acontecer na presença de ar, ácidos concentrados, aumento de temperatura por volta de 65°C, e é acelerada pela presença de metais pesados. Meios 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, 1987; MERCK INDEX, 1996; USP XXIX, 2006).

2.4 Aplicações da Papaína

Varias são as aplicações da papaína, em diversas indústrias, na medicina, na odontologia e como ferramenta em pesquisas.

Para a indústria de alimentos a papaína 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 é adicionada para aumentar o poder de limpeza pela degradação hidrolítica de proteínas presentes em manchas. Na industrialização do couro, a papaína age na degradação do colágeno e é empregada no processo de remoção dos pêlos e amaciamento do couro (SASMITO; DEMEESTER; BRACKE, 1982).

Na indústria cosmética, é um potente ingrediente ativo adicionado a 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). Para Traversa (2003) a papaína atua 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). A combinação da papaína com outras substâncias, tais como ureia e clorofilada estão dispostas para o comércio. Sendo comercializada com o nome de Panafil® (KLASEN, 2000). Além dessa, há a Accuzime®, adicionada de papaína e ureia, e o produto italiano NouriFusion®, contendo papaína e as vitaminas A, C e E.

LOPES (2003) menciona a segurança e eficácia quando utilizada como promotor de absorção cutâneo. Mecanismos 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, à formulação gel para remoção química da cárie, principalmente para aplicação na odontopediatria. No comércio existe o produto Papacárie®, promovendo a remoção do tecido cariado e infectado, preservando os tecidos saudáveis adjacentes do dente, sem ocasionar qualquer dano aos tecidos da boca (SILVA, 2005).

DUARTE et al. (2001) considera a papaína como agente tópico irrigador em tratamento de canais. Outra utilização é na remoção do tártaro, pelo amolecimento do mesmo e diminuindo, assim, o desconforto do procedimento (DAVANÇO, 2004).

Para a indústria farmacêutica as propriedades proteolíticas da papaína são eficazes principalmente em medicamentos de usos oral e tópico. Os medicamentos de uso oral são comercializados como digestivos, auxiliando na degradação das proteínas da dieta, como o Filogaster®, contendo pancreática, diástase e papaína (DEF, 2002; WALSH; HEADON, 1994). O uso oral dessa enzima pode também prevenir a aderências intrabdominais pós-operatórias, por se tratar de um agente fibrinolítico (HELFEBREKERS et al., 2000), no tratamento da mucosite, como anti-inflamatório e também 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).

O debridamento 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 de feridas e de queimaduras, de modo a acelerar o processo de cicatrização dessas lesões. (AYELLO; CUDDIGAN, 2004; LAIDET; LETOUNEUR, 1993; MONETTA, 1990).

Para a cicatrização de feridas e queimaduras e prescindível a retirada de tecidos desvitalizados, evitando 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). MANDELBAUM S., SANTIS E

MANDELBAM M. (2003) indicam que a papaína pode ser usada em todas as fases do processo de cicatrização, sejam feridas secas ou exsudativas, colonizadas ou infectadas, com ou sem áreas de necrose.

Através da ação da papaína que 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, formando cadeias lineares, evitando, assim, a formação de quelóides, que é um aglomerado aleatório de fibras que formam o tecido conjuntivo.

FLINDT (1978) indica que a papaína aja somente 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 saudáveis.

OTUKA, PEDRAZZANI E PIOTO (1996) relatam que soluções extemporâneas de papaína são de grande ajuda no tratamento da úlcera plantar, acelerando ou evoluindo o processo de cicatrização. Lesões, contendo ou não tecido necrosado, cicatrizam mais rapidamente 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, 1996).

2.5 Objetivo geral

Analisar o perfil proteico da ação da papaína sobre amostras de carne via SDS-PAGE usando concentrações específicas, tempos pré-determinados e duas variações de temperaturas (20°C e 65°C).

2.6 Objetivos específicos

- Comparar os tempos 5, 10 e 15min de exposição do princípio ativo da papaína sobre a amostra;
- Avaliar o efeito do princípio ativo nas temperaturas de 20°C e 65°C;
- Relacionar as diferentes concentrações (0,1, 0,25 e 0,50%) com a ação do princípio ativo;

2.7 Material e Métodos

2.7.1 Amostra

As amostras são de origem animal do músculo semitendinoso de bovinos (*Bos taurus taurus*) adquirido no comércio local (São Gabriel - RS), de onde se retirou fragmentos de 0,5g do corte de carne Lagarto (tatu). Os experimentos foram realizados em duplicata. Os fragmentos foram tratados com princípio ativo papaína (lote DCBC 2525 - padrão SIGMA) em concentrações de 1%, 2,5% e 5% e tempos e exposição de 5, 10 e 15 minutos com temperaturas diferenciadas em temperatura ambiente (20°C) e aquecido a 65° C (banho-maria). Dois grupos controle sem adição de aditivo foram submetidos à mesma análise para posterior comparação (Quadro 1). Após o período de tratamentos as amostras passaram por lavagem em água destilada (3 vezes).

Quadro 1: Concentração, tempo de exposição e temperatura da amostras.

		Temp. ambiente	Temp. 65°C	Temp. ambiente	Temp. 65°C	Temp. ambiente	Temp. 65°C
A	Papaína 0,1%	5 min. A1 	5 min. A2 	10 min. A3 	10 min. A4 	15 min. A5 	15min A6 
B	Papaína 0,25%	5 min. B1 	5 min. B2 	10 min. B3 	10 min. B4 	15 min. B5 	15min B6 
C	Papaína 0,5%	5 min. C1 	5 min. C2 	10 min. C3 	10 min. C4 	15 min. C5 	15min C6 
D	Controle	5 min. D1 		10 min. D2 		15 min. D3 	
E	Controle		5 min. E1 		10 min. E2 		15 min. E3 
	Total	8	8	8	8	8	8

Fonte: ROSSO, 2014.

Concentrações de papaína foram pesadas em balança de precisão e misturadas em água destilada utilizando agitador magnético e barra magnética.

2.7.2 Maceração das amostras

As amostras depois de tratadas e lavadas foram maceradas utilizando nitrogênio líquido em almofariz com pistil, para a quebra e a homogeneização das partículas celulares, sendo mantidas a baixas temperaturas, evitando a degradação e desnaturação de suas proteínas.

2.7.3 Centrifugação

As amostras maceradas foram homogeneizadas em tampão contendo Tris, NaCl, EDTA e SDS nas respectivas concentrações de 0,00605, 0,008766, 0,000372 e 0,001% na proporção 4/1 (quatro partes do tampão para uma parte de amostra). As amostras foram centrifugadas em centrífuga refrigerada por 20 minutos, 14.000 RPM a 4°C. Após foi recolhido o sobrenadante, descartando o restante, que foi identificado e congelado em freezer a -80°C.

2.7.4 Separação de Proteínas por SDS-PAGE

Para a preparação na placa de gel de poliacrilamida foi de acordo com HEUSSEN e DOWDLE (1980) e as modificações feitas por MICHAUD, FAYE e YELLE (1993) para a papaína (Quadro 2). A placa foi montada com gel de concentração (4% - pH 6,8) e gel de separação contendo acrilamida 12% (pH 8,8), de acordo com o Quadro 1.

Quadro 2: Composição do Gel de Poliacrilamida.

Componentes para 10 mL	Gel de separação (12%)	Gel de concentração (4%)
30% de Acrilamida/ Bisacrilamida (1%)	4,0 mL	1,3 mL
DDI H ₂ O	3,4 mL	6,1 mL
TRIS 1,5M	2,5 mL	2,5 mL
10% w/v SDS	0,1 mL	0,1 mL
TEMED	100 mg	100 mg
Persulfato de Amônio 10%	100 mg	100 mg

Fonte: ROSSO, 2014.

As amostras foram descongeladas e homogeneizada 1mL de cada duplicata, após foi misturado ao corante SAMPLE BUFFER (4x), para a produção dos dois primeiros géis capacidade de 150µL foram utilizadas as quantidades de 140µL de amostra e 10µL de corante, sendo em seguida homogeneizada e aplicada ao gel, que teve sua voltagem configurada para 50A. Sua disposição no gel segue como no Quadro 3:

Quadro 3: Identificação das amostra para os géis 1 e 2 de poliacrilamida.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Gel 1	M	D1	E1	D2	E2	D3	E3	A1	A2	A3	A4	A5	A6	M
Gel 2	M	B1	B2	B3	B4	B5	B6	C1	C2	C3	C4	C5	C6	M

Fonte: ROSSO, 2014.

Para a produção do terceiro gel foi usado cuba de menor capacidade, com proporções de 20µL, sendo 15µL de amostra e 5µL de corante SAMPLE BUFFER (4x), e foram utilizadas as amostras com tempo de 10 minutos como observado no Quadro 4:

Quadro 4: Identificação das amostra para o gel 3 de poliacrilamida.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Gel 3	M	D2	E2	A3	A4	B3	B4	C3	C4	M

Fonte: ROSSO, 2014.

Após o término do SDS-PAGE, o gel foi corado em COOMASIE BLUE - 250 em banho-maria a uma temperatura de 60°C por 30 minutos, e após a coloração foi removido o excesso em água fervente por 10 minutos, ficando somente as bandas marcadas com COOMASIE BLUE - 250 que tinham afinidade com entre a proteína e o corante.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

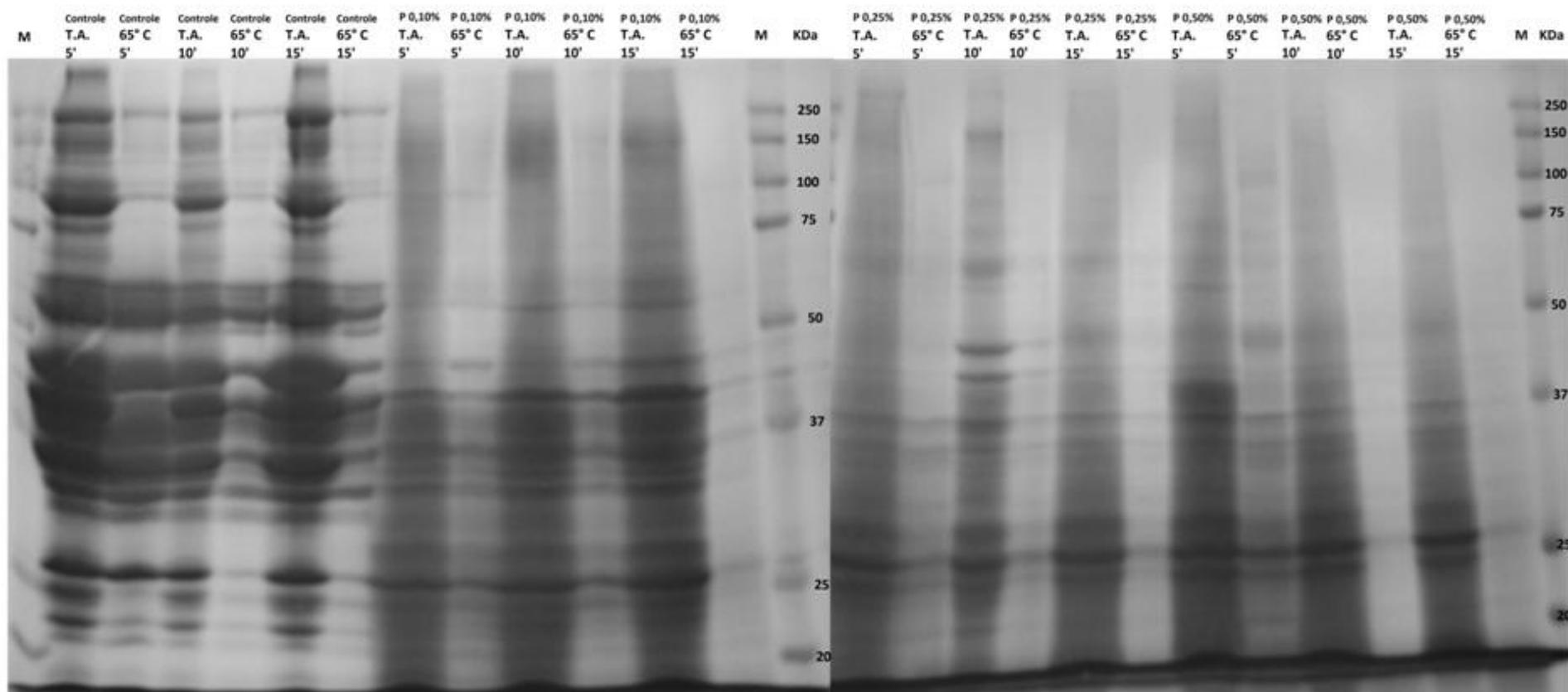
Na figura 1 está demonstrado a análise eletroforética em gel de poliacrilamida com SDS, podemos observar o grupo controle formado por 6 amostras, sendo 3 amostras a temperatura ambiente (20°C) e com tempos de 5, 10 e 15 minutos e outras 3 amostras com a mesma variação de tempo, e condicionados a temperatura de 65°C. Para a ação do princípio ativo papaína foram utilizados 3 tipos de concentrações, a 1%, 2,5% e 5% nas temperaturas e tempos iguais ao do controle.

A análise indicou perda de bandas, entre as concentrações e o controle, significando a quebra ou destruição de uma proteína ou um aglomerado de proteínas, isso pode ser observado mais efetivamente a 250 KDa, a entorno de 100 KDa, próximo a 50 KDa, assim como a manutenção das banda em menor expressão a 37 KDa e um pouco acima de 25 KDa.

Para a análise dos tempos, observou-se que não houve uma variância significativa entre os tempos preestabelecidos, significando que a ação do princípio ativo da papaína já age nos 5 primeiros minutos da aplicação.

A variação das concentrações do princípio ativo papaína, indica que quanto mais concentrado mais ação está ocorrendo na amostra.

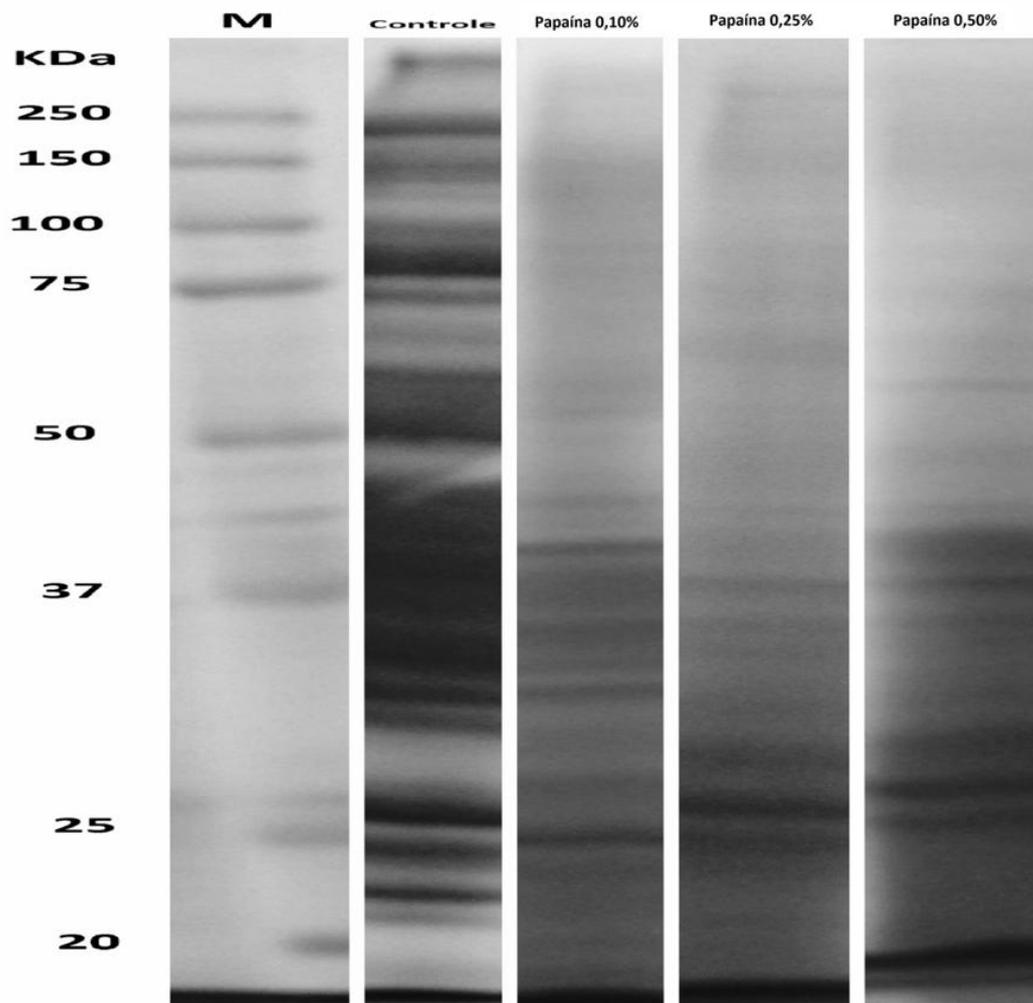
Figura 1 Análise eletroforética em placa de gel de poliacrilamida com SDS, com M = marcadores moleculares, Controles T.A. 20°C (temperatura ambiente) e 65°C. Concentração de Papaína de 0,10%, 0,25% e 0,50%. Tempos de exposição 5', 10' e 15 minutos.



Fonte: LPA, 2014; ROSSO, 2014.

Na figura 2 foram analisados somente o controle e as concentrações de Papaína a temperatura ambiente no tempo de 5 minutos e observou a redução de das bandas de alto peso molecular (de 250 KDa até 50 KDa), indicando a clivagem destas proteínas.

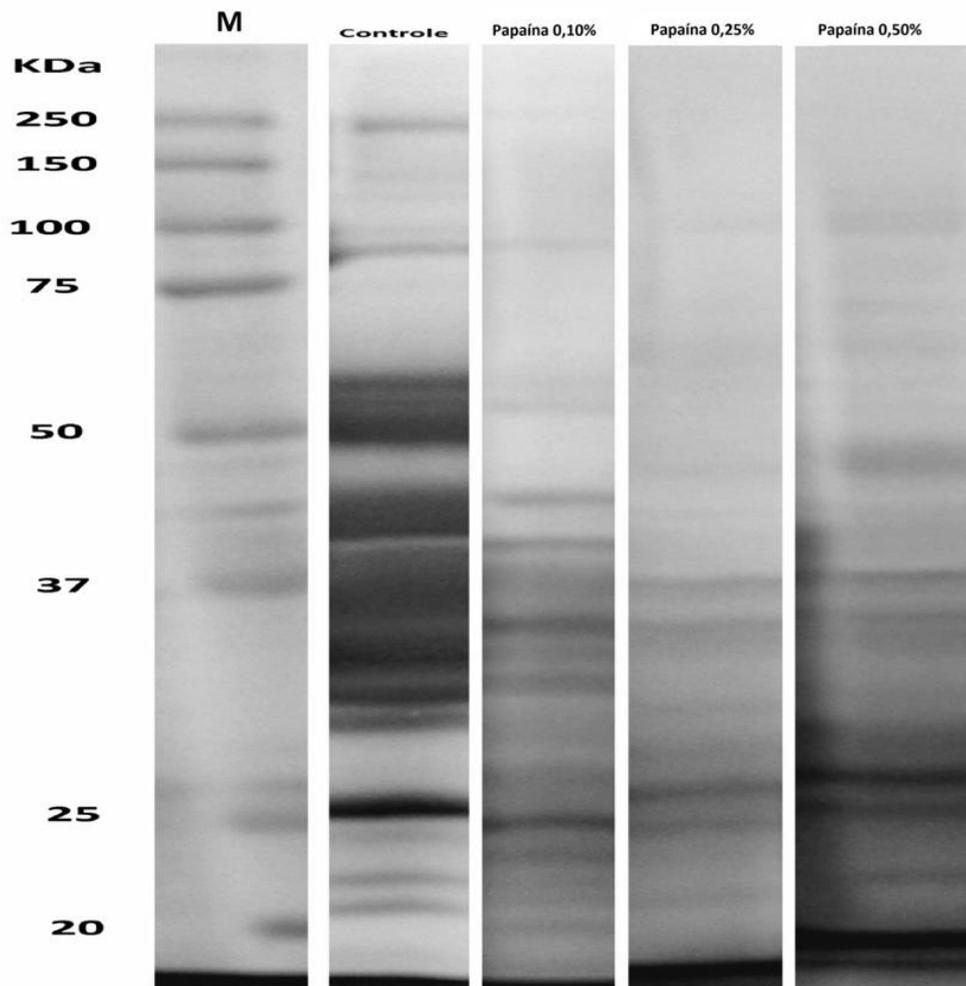
Figura 2 Gel de poliacrilamida, com M = marcadores moleculares, Controles T.A. 20°C (temperatura ambiente). Concentração de Papaína de 0,10%, 0,25% e 0,50%. Tempo de exposição 5 minutos.



Fonte: LPA, 2014; ROSSO, 2014.

Na figura 3 foram analisados somente o controle e as concentrações de papaína a 65°C no tempo de 5 minutos e observou que com o cozimento das amostras já há um redução das bandas e assim como na temperatura ambiente a redução de das bandas de alto peso molecular (de 250 KDa até 50 KDa), indicando a quebra ou destruição destas proteínas.

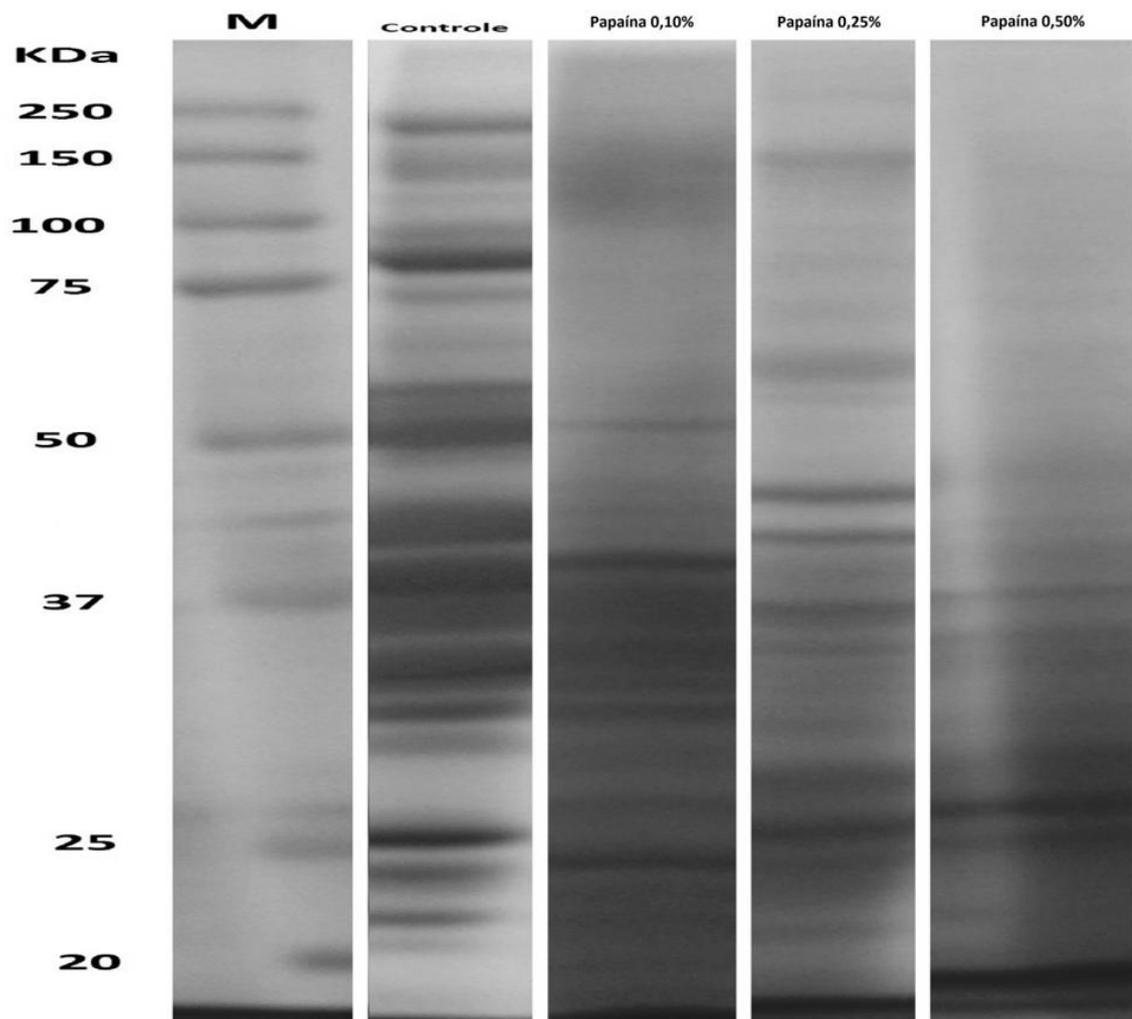
Figura 3 Gel de poliacrilamida, com M = marcadores moleculares, Controles 65°C. Concentração de Papaína de 0,10%, 0,25% e 0,50%. Tempo de exposição 5 minutos.



Fonte: LPA, 2014; ROSSO, 2014.

Na figura 4 foram analisados somente o controle e as concentrações de papaína a temperatura ambiente no tempo de 10 minutos e observou que as amostras com concentração de 5% de papaína obtiveram quebra de quase todas as proteínas com o peso molecular a cima de 37 KDa.

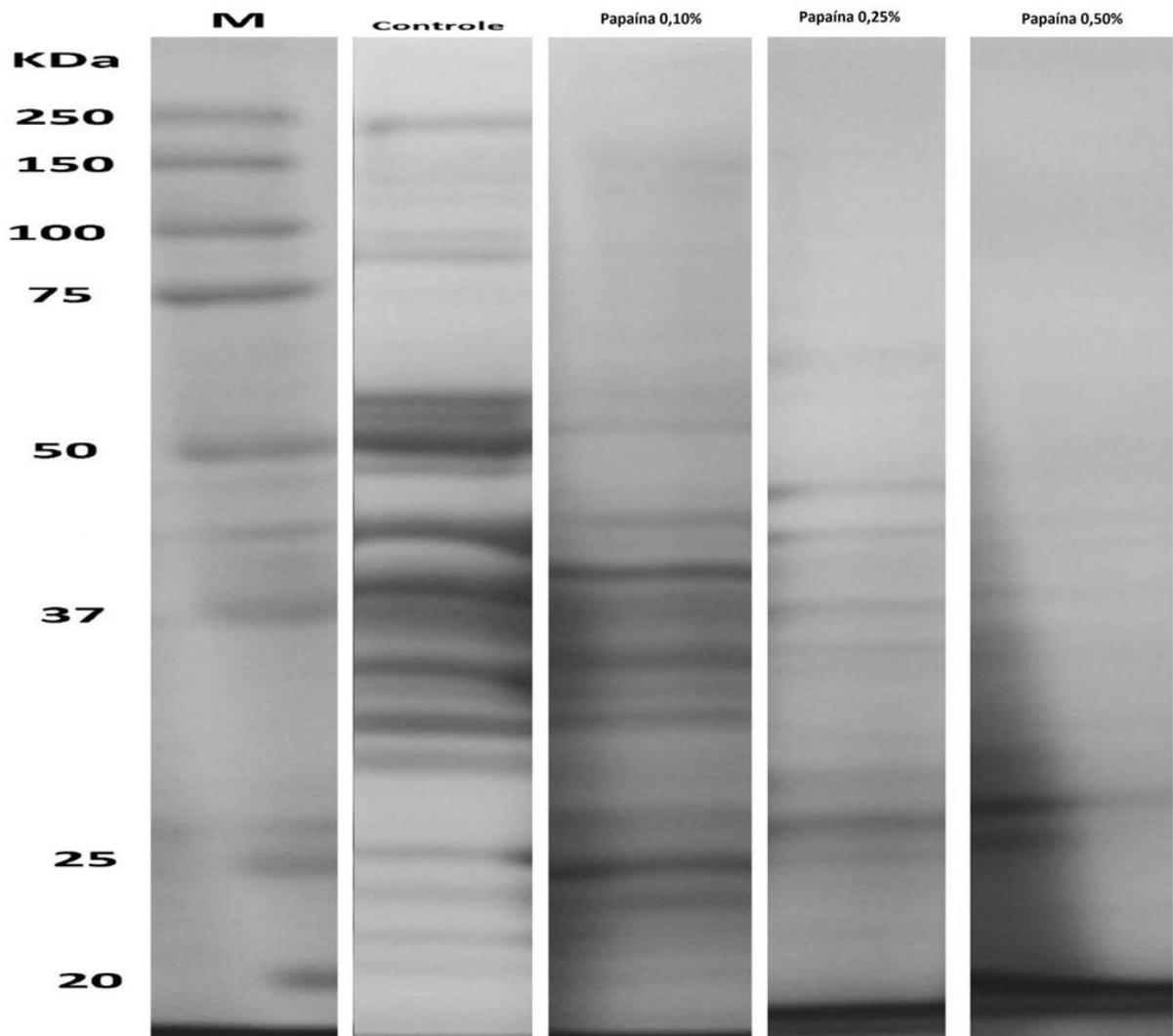
Figura 4 Gel de poliacrilamida, com M = marcadores moleculares, controle T.A. 20°C (temperatura ambiente). Concentração de Papaína de 0,10%, 0,25% e 0,50%. Tempo de exposição 10 minutos.



Fonte: LPA, 2014; ROSSO, 2014.

Na figura 5 o controle e as concentrações de papaína a temperatura de 65°C e no tempo de 10 minutos observou-se que a ativação do princípio ativo esta condicionada a temperatura ótima de 65°C, havendo uma quebra ou destruição de grande parte das proteínas, podemos relacionar a concentração com a temperatura e indicar o aumento significativo à ativação da papaína.

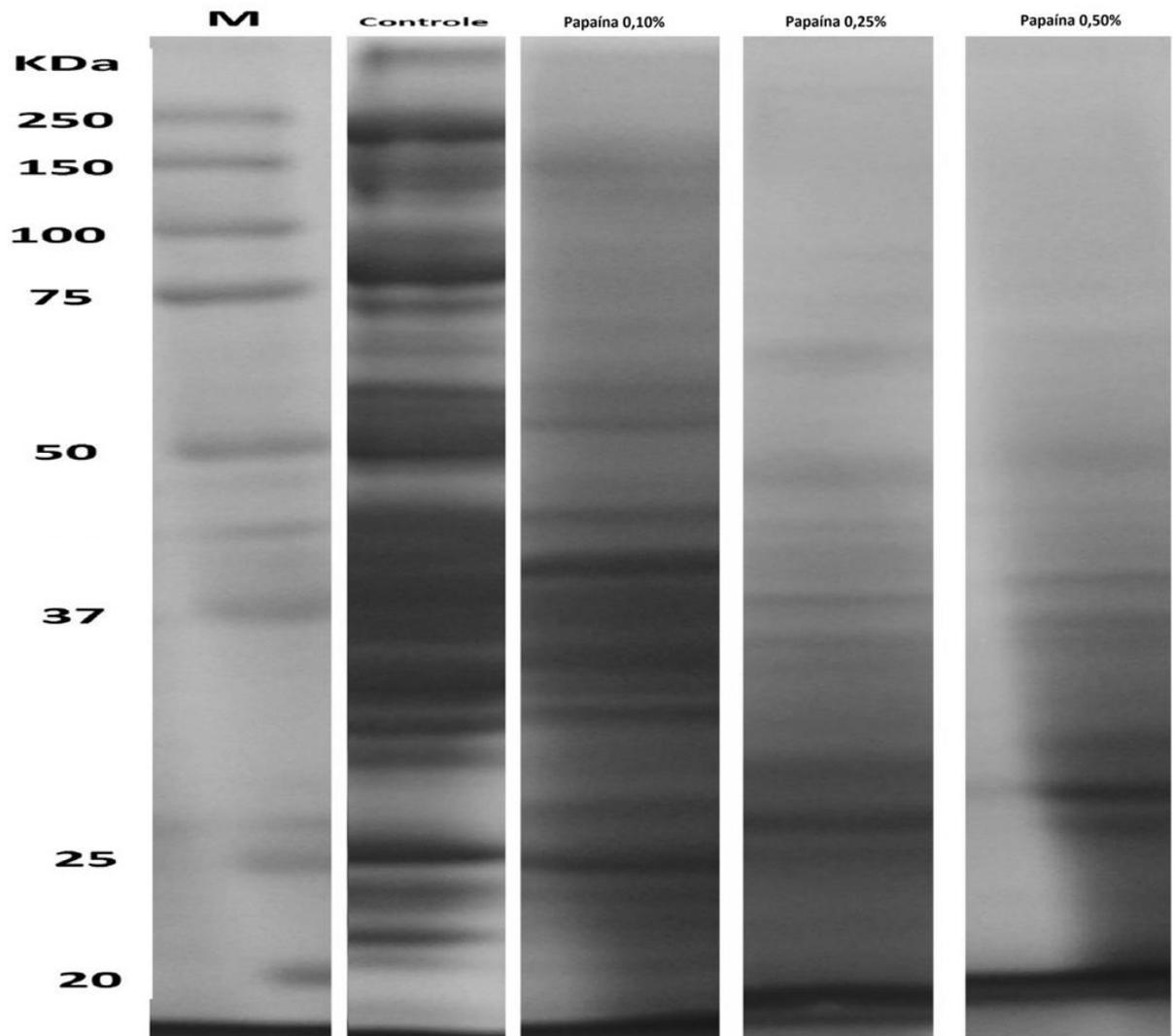
Figura 5 Gel de poliacrilamida, com M = marcadores moleculares, controle a 65°C. Concentração de Papaína de 0,10%, 0,25% e 0,50%. Tempo de exposição 10 minutos.



Fonte: LPA, 2014; ROSSO, 2014.

Na figura 6 o controle e as concentrações de papaína a temperatura ambiente e no tempo de 15 minutos nos indica a eliminação quase que total das bandas acima de 75 KDa, ocorrendo uma destruição ou separação destas proteínas.

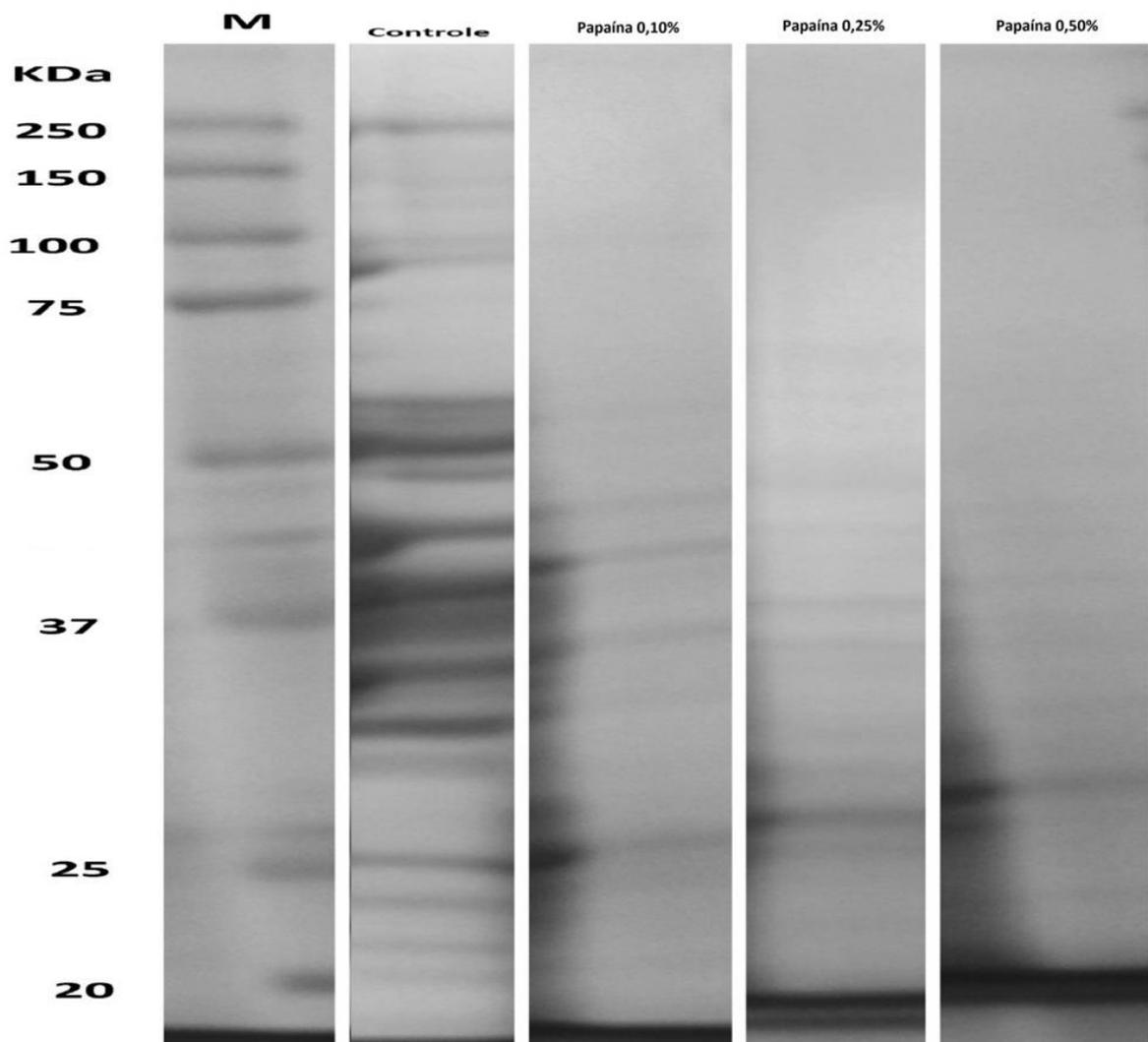
Figura 6 Gel de poliacrilamida, com M = marcadores moleculares, controle T.A. 20°C (temperatura ambiente). Concentração de Papaína de 0,10%, 0,25% e 0,50%. Tempo de exposição 15 minutos.



Fonte: LPA, 2014; ROSSO, 2014.

Na figura 7 o controle e as concentrações de papaína a temperatura 65°C e no tempo de 15 minutos nos indica a eliminação quase que total das bandas acima de 37 KDa, ocorrendo uma destruição ou separação destas proteínas, indicando que a temperatura ótima para a ação da Papaína sobre o músculo semitendinoso e de 65° C.

Figura 7 Gel de poliacrilamida, com M = marcadores moleculares, controle a temperatura de 65°C. Concentração de Papaína de 0,10%, 0,25% e 0,50%. Tempo de exposição 15 minutos.

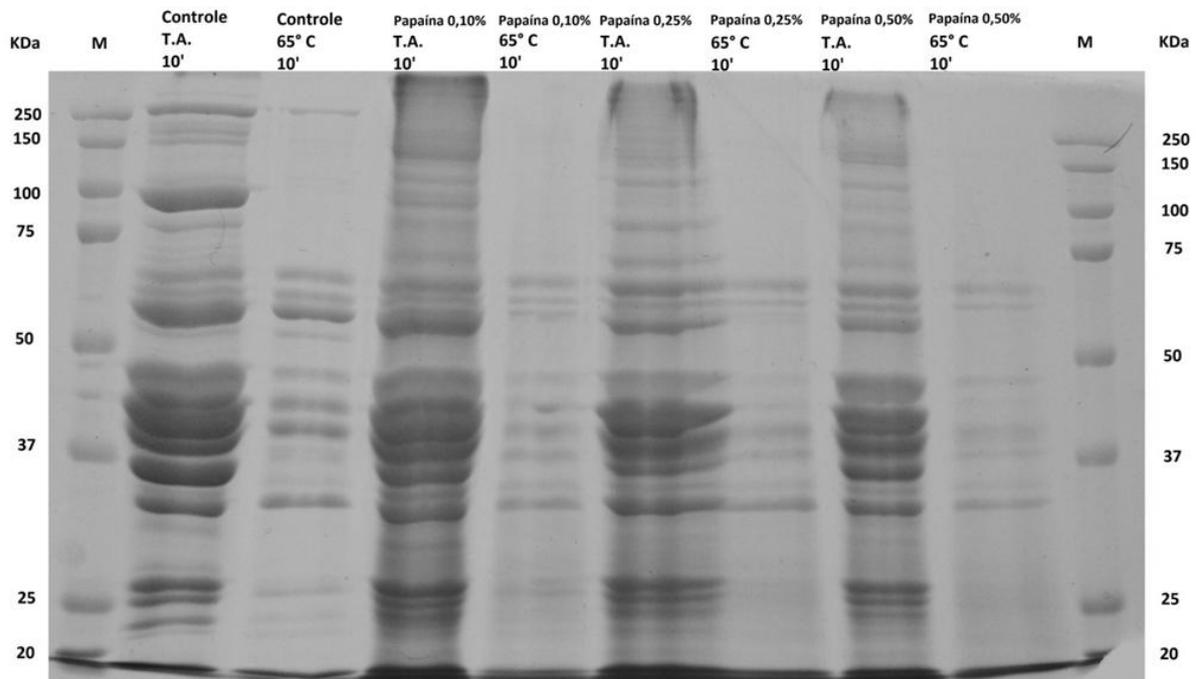


Fonte: LPA, 2014; ROSSO, 2014.

Na figura 8 demonstra a análise eletroforética em placa de poliacrilamida com SDS, aonde podemos ver o grupo controle formado por 2 amostras, sendo uma amostra a temperatura ambiente e com tempos de 5, 10 e 15 minutos e outras mostra com a mesma variação de tempo, e condicionados a temperatura de 65°C. Para a ação do princípio ativo papaína foram utilizados 3 tipos de concentrações, a 0,10%, 0,25% e 0,50% nas temperaturas e tempos iguais ao do controle.

Neste gel, a banda indicada no controle a 65°C com peso molecular de 250 KDa, se degrada ou quebra suas ligações nas concentrações de papaína testadas no experimento, assim como uma banda a 50 KDa, ao contrario podemos ver a manutenção de 8 banda entre o peso molecular 25 e 75 KDa, indicando que a Papaína não age sobre essas proteínas.

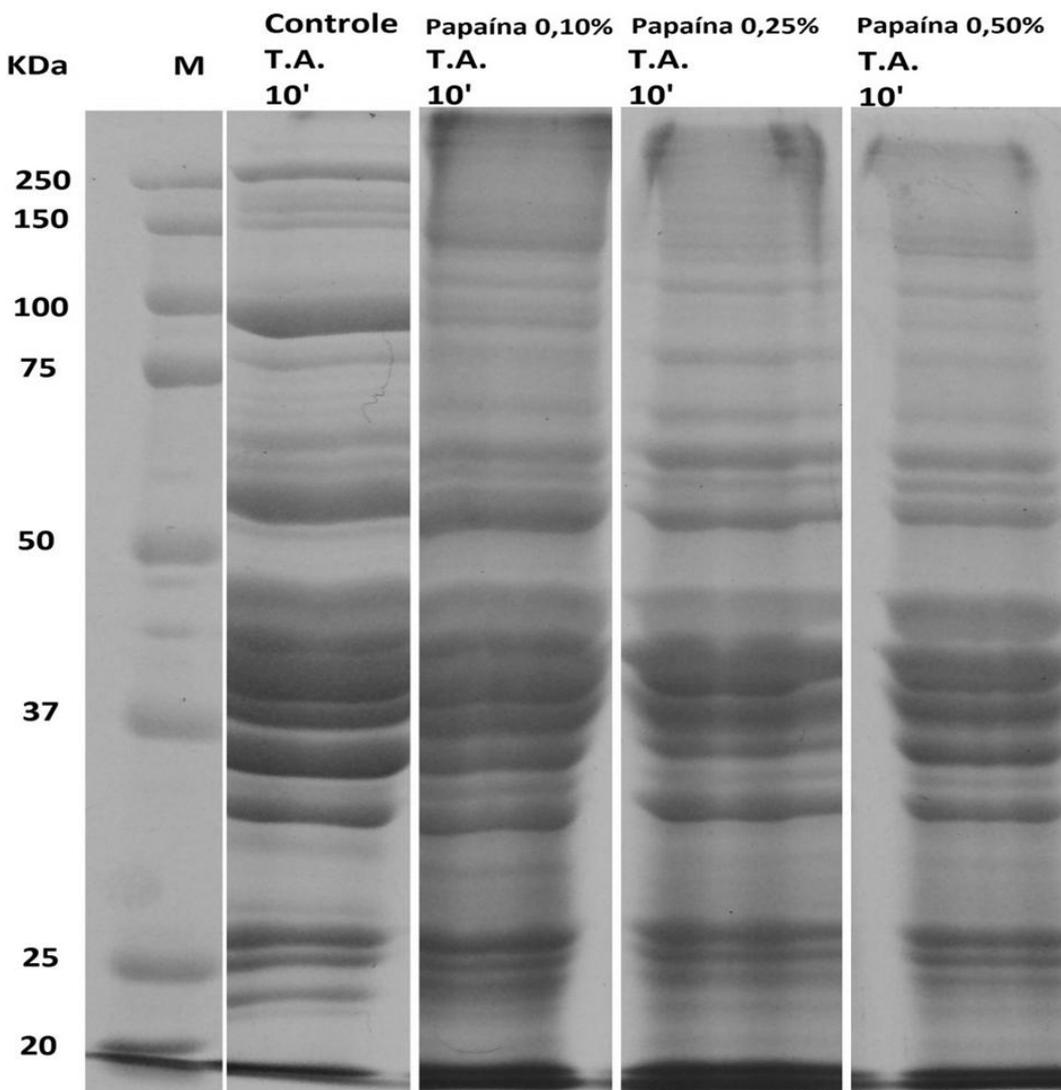
Figura 8 Análise eletroforética em placa de gel de poliacrilamida com SDS, com M = marcadores moleculares, Controles T.A. 20°C (temperatura ambiente) e 65°C. Concentração de Papaína de 0,10%, 0,25% e 0,50%. Tempo de exposição 10 minutos.



Fonte: LPA, 2014; ROSSO, 2014.

Na figura 9 o controle e as concentrações de papaína a temperatura ambiente e no tempo de 10 minutos observou-se a redução no tamanho das bandas das concentrações em relação ao controle. Além da eliminação da banda de 250 KDa nas concentrações de 0,10%, 0,25% e 0,50% .

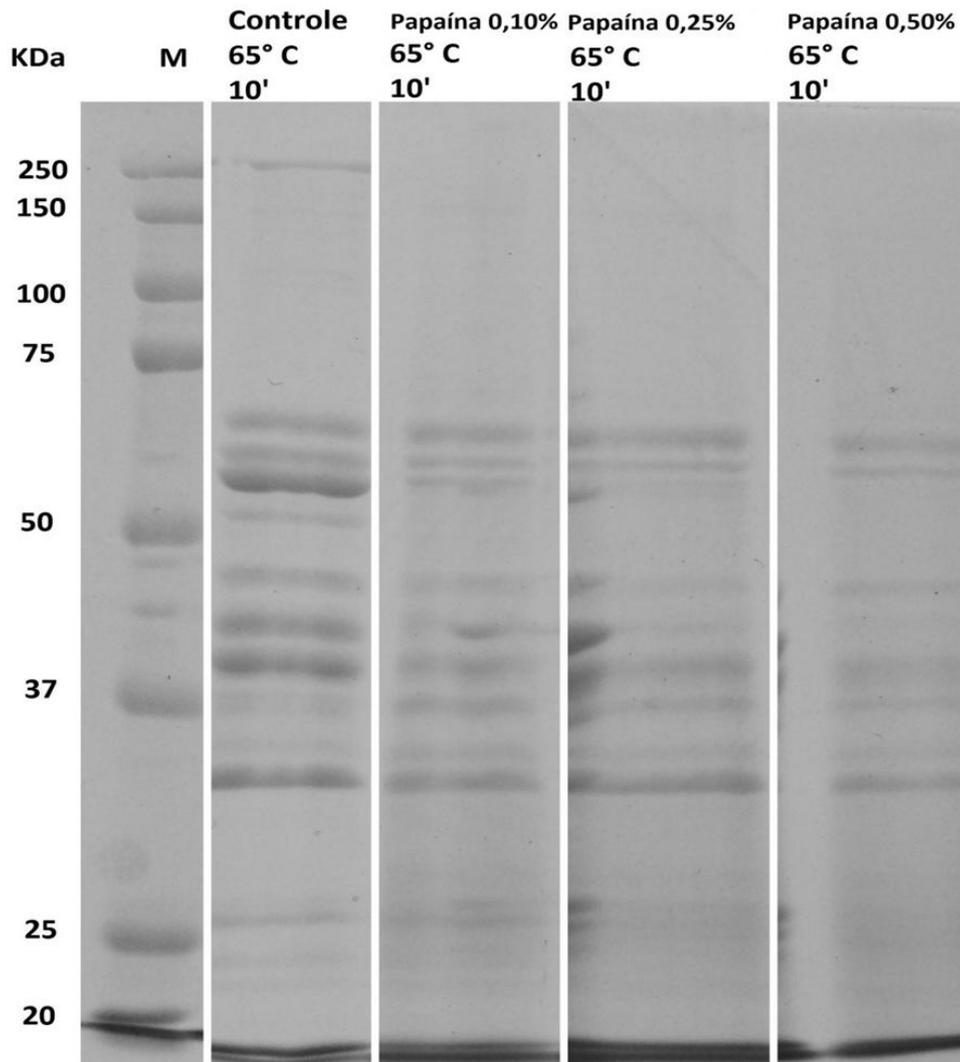
Figura 9 Gel de poliacrilamida, com M = marcadores moleculares, controle T.A. 20°C (temperatura ambiente). Concentração de Papaína de 0,10%, 0,25% e 0,50%. Tempo de exposição 10 minutos.



Fonte: LPA, 2014; ROSSO, 2014.

Na figura 10 o controle e as concentrações de papaína a 65°C e no tempo de 10 minutos observou-se a existência de 14 bandas no controle, 12 bandas na amostra de 0,10% de Papaína, 12 bandas na amostra de 0,25% com melhor expressão do que a de 1% e 8 bandas com a concentração de 0,50% de papaína. Indicando a relação de concentração e ação do princípio ativo na amostra.

Figura 10 Gel de poliacrilamida, com M = marcadores moleculares, controle a temperatura de 65°C. Concentração de papaína de 0,10%, 0,25% e 0,50%. Tempo de exposição 10 minutos.



Fonte: LPA, 2014; ROSSO, 2014.

Estes resultados vão ao encontro com os encontrados por KIMMEL et. al. (1954) que para a ação catalítica da papaína ser ativada é necessário de um grupo sulfidrila livre e um agente externo como exemplo o aumento da temperatura.

SASMITO et. al. (1982) relatam que a papaína age na degradação hidrolítica das proteínas e assim como na degradando o colágeno das fibras, indo ao encontro dos resultados como demonstrado na perda de banda no gel de poliacrilamida de maior peso molecular.

Podemos indicar ZHUANG (1991) que descreve a papaína como uma estrutura estabilizada por possuir ligações de dissulfeto, uma vez que essas ligações são destruídas há uma redução na ativação biológica, catalítica e imunológica da enzima podendo assim ter sua quebra.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados demonstrados através da análise eletroforética em gel de poliacrilamida com SDS indica que a papaína pode ser utilizada para quebra ou degradação de alguns tipos de proteínas e se relacionarmos com a maciez da carne, podemos resaltar que através do princípio ativo da papaína conseguimos romper ligações peptídicas envolvendo aminoácidos básicos e assim possibilitando a atividade proteolítica na amostra.

Concluimos que o princípio ativo da Papaína sobre o músculo semitendinoso de *Bos taurus taurus* tem sua ação efetivada a temperatura de 65°C, e na concentração de 5%, e no fator tempo não houve uma diferença significativa entre os resultados encontrados.

REFERÊNCIAS

- ALVES, D. D.; GOÊS, R. H. T. B.; MANCIO, A. B. **Maciez da carne bovina**. *Ciência Animal Brasileira*, 6:(3)135-149. 2005.
- ANDERSEN, H. J.; OKSBJERG, N.; YOUNG, J. F.; THERKILDSEN, M. **Feeding and meat quality – a future approach**. *Meat Science*, 70:543–554. 2005.
- 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.
- BELCHER, K. W.; GERMANN, A. E.; SCHMUTZ, J. K. **Beef with environmental and quality attributes: Preferences of environmental group and general population consumers in Saskatchewan, Canada**. *Agriculture and Human Values*, 24:333–342. 2007.
- 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.
- BIANCHINI, W.; SILVEIRA, A. C.; JORGE, A. M.; ARRIGONI, M. B.; MARTINS, C. L.; RODRIGUES, E.; HADLICH, J. C.; ANDRIGHETTO, C. **Efeito do grupo genético sobre as características de carcaça e maciez da carne fresca e maturada de bovinos super precoces**. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 36:2109-2117. 2007.
- 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.
- BRONDANI, I. L.; SAMPAIO, A. A. M.; RESTLE, J.; ALVES FILHO, D. C.; FREITAS, L. S.; AMARAL, G. A.; SILVEIRA, M. F.; CEZIMBRA, I. M. **Composição física da carcaça e aspectos qualitativos da carne de bovinos de diferentes raças alimentados com diferentes níveis de energia**. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35(5):2034- 2042. 2006.
- 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.

COSTA, C.; MEIRELLES, P. R. L.; SAVASTANO, S.; ARRIGONI, M. B.; SILVEIRA, A. C.; ROÇA, R. O.; MOURÃO, G. B. **Efeito da castração sobre a qualidade da carne de bovinos superprecoces.** Veterinária e Zootecnia, 14(1):115-123. 2007.

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

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.

EMATER. Rio Grande do Sul/Ascar. **Relatório de atividades 2012** / Emater/RS-Ascar. – Porto Alegre : Emater/RS-Ascar, 2013. 131 p. : il..2012.

FARSUL - Federação da Agricultura do Estado do Rio Grande do Sul. **Relatório Econômico 2012 e Perspectivas para 2013.** Sul Rural. Farsul, 2012. Disponível em <http://www.farsul.org.br/arquivos/RELAT%C3%93RIO%20ECON%C3%94MICO%202012.pdf>. Acesso em 15 de setembro de 2013.

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

FLÁVIO, E.F.; MATOS, D.H.; SILVEIRA, I.L. **Utilização da papaína in natura e industrializada, no amaciamento de carne bovina.** *Oikos,* 6(1):28-30. 1989.

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

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.

Heinemann, R. J. B.; Pinto, M. F. **Efeito da injeção de diferentes concentrações de cloreto de cálcio na textura e aceitabilidade de carne bovina maturada.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos,* 23:146-150. 2003.

HELFEKREKERS, 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.

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.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estatística da Produção Pecuária Junho de 2012.** Governo Federal, 2012. Disponível em http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abat-e-leite-couro-ovos_201201_publicacao_completa.pdf. Acesso em 23 de setembro de 2013.

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

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.

KUSS, F.; LÓPEZ, J.; RESTLE, J.; BARCELLOS, J. O. J.; MOLETTA, J. L.; LEITE, M. C. C. P. **Qualidade da carne de novilhos terminados em confinamento e abatidos aos 16 ou 26 meses de idade.** *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39(4):924-931. 2010.

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

LEHESKA, J.; WULF, D. M.; CLAPPER, J. A.; THALER, R. C.; MADDOCK, R. J. **Effects of high-protein/low-carbohydrate swine diets during the final finishing phase on pork muscle quality.** *Journal of Animal Science*, 80:137-142. 2002.

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

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.

MALTIN, C.; BALCERZAK, D.; TILLEY, R.; DELDAY, M. **Determinants of meat quality: tenderness.** *Proceedings of the Nutrition Society*, 62:337-347. 2003.

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.

MARTINDALE: **The complete Drug reference.** Londres, 34a 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.

MITCHEL, R.E.J.; CHAIKEN, I.M.; SMITH, E.L.. **Journal Biology Chemistry.** v. 45, p.

3485. 1970.

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.

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.

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.

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

MUCHENJE, V.; DZAMA, K.; CHIMONYO, M.; STRYDOM, P. E.; HUGO, A.; RAATS, J. G. **Some biochemical aspects pertaining to beef eating quality and consumer health: A review.** Food Chemistry, 112:279–289. 2009.

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 allergic rhinoconjunctivitis in cosmetologist. J. Allergy Clin. Immunol.** v. 92, n. 3, p. 492- 493. 1993.

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.

PACHECO, P. S.; RESTLE, J.; SILVA, J. H. S.; BRONDANI, I. L.; PASCOAL, L. L.; ALVES FILHO, D. C.; ARBOITTE, M. Z.; FREITAS, A. K. **Composição Física da Carcaça e Qualidade da Carne de Novilhos Jovens e Superjovens de Diferentes Grupos Genéticos.** Revista Brasileira de Zootecnia, 34(5):1691-1703. 2005.

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.

PEDREIRA, A. C. M. S.; LEME, P. R.; PEREIRA, A. S. C.; LUCHIARI FILHO, A. **Propionato de cálcio no amaciamento do músculo *Longissimus dorsi* de bovinos de corte.** Revista Brasileira de Zootecnia, 32:(5)1213-1219. 2003.

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.

PURSLOW, P. P. **Intramuscular connective tissue and its role in meat quality**. Meat Science, 70:435–447. 2005.

RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A. M. **Avaliação da qualidade de carne: fundamentos e metodologias**. Viçosa-MG:Editora UFV, 599p. 2007.

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.

ROSENVOLD, K.; PETERSEN, J. S.; LAERKE, H. N.; JENSEN, S. K.; THERKILDSEN, M.; KARLSSON, A. K.; MOLLER, H. S.; ANDERSEN, H. J. **Muscle glycogen stores and meat quality as affected by strategic finishing feeding of slaughter pigs**. Journal of Animal Science, 79:382-391. 2001.

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.

SANCHEZ NETO, R.. **Aspectos morfológicos e morfométricos 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.

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

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.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos**. São Paulo, SP: Varela, p. 517. 1996.

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.

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.

VAZ, F. N.; RESTLE, J.; FEIJÓ, G. L. D. **Qualidade e composição química da carne de bovinos de corte inteiros ou castrados de diferentes grupos genéticos Charolês x Nelore**. Revista Brasileira de Zootecnia, 30(2):518-525. 2001.

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

WORLD Agricultural Supply and Demand Estimates. **UNITED STATE DEPARTMENT OF AGRICULTURAL-USDA**. n. 516, 08 mar. 2013. Disponível em: <http://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/latest.pdf>. Acesso em: 28 setembro 2013.

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.