



## Determination of Papain Activity in Topical Dosage Forms: Single Laboratory Validation Assay

Claudinéia A.S.O. PINTO <sup>1\*</sup>, Denise GREEN <sup>1</sup>, André R. BABY <sup>1</sup>,  
Gabriele W. RUAS <sup>1</sup>, Telma M. KANEKO <sup>1</sup>, Sandro R. MARANA <sup>2</sup> & Maria V.R. VELASCO <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmacy, School of Pharmaceutical Sciences;

<sup>2</sup> Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo,  
FCF-USP. 580 Prof. Lineu Prestes Av., blocos 13/15,  
Conjunto das Químicas, Cidade Universitária, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil

**SUMMARY.** Papain is a proteolytic enzyme used in topical formulations for peeling and treatment of burns, wounds and scars. It is also used as progressive depilatory agent and as cutaneous absorption enhancer. This work was aimed at validating a spectrofluorimetric method to quantify the activity of papain in semisolid pharmaceutical dosage forms. Benzylloxycarbonyl-phenylalanyl-arginine 7-amido-4-methylcoumarin was used as substrate in assays performed in microplates. The production of 7-amido-4-methylcoumarin (7-MCA) over different periods of time was used to quantify the concentration of papain in pharmaceutical forms. This method presented a linear relationship between papain concentration and rate of 7-MCA production ( $R = 0.9974$ ). Besides that, the method presented an estimated detection limit (LOD) of  $0.040 \text{ USP.mL}^{-1}$ , an estimated quantification limit (LOQ) of  $0.12 \text{ USP.mL}^{-1}$ , a precision (RSD%) ranging from 2.7 to 5.0 and an accuracy (E%) of 95.3 to 96.7. Components of the tested topical formulation did not interfere in the papain detection. Finally, the method is simple and fast.

**RESUMEN.** "Determinación de la Actividad de la Papaína en Formas Farmacéuticas Tópicas: de la Metodología Analítica". La papaína es una enzima proteolítica usada en formulaciones tópicas para el tratamiento de quemaduras, heridas, cicatrices, exfoliación de la piel mediante depilado, así como agente depilatorio progresivo y para incrementar la absorción cutánea. El presente trabajo tiene como finalidad validar una metodología que cuantifique la actividad de la papaína en formas farmacéuticas semisólidas. Para la validación del método fueron considerados los siguientes parámetros: linealidad, especificidad, límite de detección, cuantificación, precisión y exactitud. Benziloxycarbonil-fenilalanina-arginina 7-amido 4-metilcumarina fue usada como sustrato para el análisis de la actividad enzimática de la papaína, la cual fue determinada por detección espectrofluorométrica de la 7-amido-4-metilcumarina adherida a microplacas. El método fue validado de acuerdo con los siguientes resultados experimentales: coeficiente de correlación ( $r = 0,9974$ ); Límite de detección ( $\text{LOD} = 0,040 \text{ USP.mL}^{-1}$ ), límite de cuantificación ( $\text{LOQ} = 0,12 \text{ USP.mL}^{-1}$ ), precisión ( $\text{RSD} \% = 2,7 \text{ a } 5,0$ ), y exactitud ( $\text{E}\% = 95,3 \text{ a } 96,7$ ), demostrando además especificidad para el ensayo realizado en las formulaciones tópicas, siendo este un método simple, rápido y con una adecuada sensibilidad.

**KEY WORDS:** Benzylloxycarbonyl-phenylalanyl-arginine 7-amido-4-methylcoumarin, Method validation, Papain, Spectrofluorometry.

**PALABRAS CLAVE:** Benziloxycarbonil-fenilalanina-arginina 7-amido 4-metilcumarina, Espectrofluorimetría, Papaína, Validación de método.

Author to whom correspondence should be addressed. *E-mail:* clausal@usp.br; clausal01@yahoo.com.br