

Validação de método analítico para análise da atividade enzimática da papaína

Caroline C. Ferraz^{1*} (IC), Gustavo H. C. Varca² (PG), Fernanda Vianna¹ (IC), Marta M. D. C. Vila¹ (PQ),
Patricia S. Lopes¹ (PQ) carolinec Ferraz@gmail.com

¹ Universidade de Sorocaba

² IPEN/CNEN/SP

Palavras Chave: papaína, BAPA, validação

Introdução

A utilização de enzimas no mercado farmacêutico tem crescido ao longo dos anos e mais produtos foram desenvolvidos a fim de explorar esse potencial na área farmacêutica. No entanto, em geral, as enzimas requerem ambientes específicos a fim de manter a bioatividade¹. A papaína tem sido empregada em tratamento de ferimentos e escaras e como um agente promotor de absorção cutânea em diversas formas farmacêuticas². No entanto, as formas farmacêuticas contendo papaína presentes no mercado não apresentam estabilidade adequada devido às características próprias da enzima, que se hidrolisa facilmente, expondo seu sítio ativo com perda de ação³. A avaliação da estabilidade enzimática baseia-se fundamentalmente no doseamento de papaína liberada em função do tempo. Assim, o objetivo deste trabalho é validar método para quantificação da enzima, permitindo avaliar a estabilidade da papaína em diversas matrizes.

Resultados e Discussão

O método empregado baseia-se no uso do BAPA (cloridrato de benzoil DL-arginina ρ -nitroanilida) como substrato cromogênico, o qual sofre hidrólise enzimática, liberando o composto ρ -nitroanilida estimado espectrofotometricamente em leitor de Elisa na faixa de 415 nm utilizando no procedimento microplacas com 96 poços.

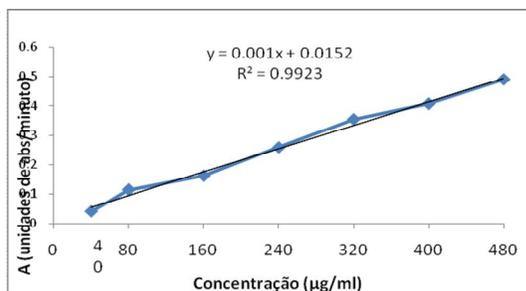


Figura 1. Curva padrão da papaína

A validação do método iniciou-se pela construção de curva analítica (Fig. 1) partindo-se de diferentes concentrações de papaína e produção do BAPA. Foi obtida a seguinte equação da reta $y=0,132x+0,0499$, onde y = absorvância, x =concentração de papaína e coeficiente de correlação igual a 0,9923 indicando a linearidade do método. A linearidade da absorvância versus tempo de reação foi satisfatória e a razão da hidrólise foi proporcional à concentração da enzima, entre 40-480 $\mu\text{g/mL}$. Obteve-se precisão de 13,33%, exatidão de 94,15%, limite de detecção de 21,2132 $\mu\text{g/mL}$ e limite de quantificação igual a 35,4207 $\mu\text{g/mL}$.

Conclusões

O substrato cromogênico utilizado para medir a atividade da papaína se mostrou sensível. O método proposto mostrou-se satisfatório para a análise da atividade enzimática da papaína considerando a linearidade da curva analítica obtida e demais resultados dos parâmetros da validação.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Programa de Iniciação Científica da Universidade de Sorocaba e ao Centro de Ciências Médicas e Biológicas (Laboratório de Biomateriais) da PUC-SP.

¹ SATISHI, H.A., KUMARA, P. R., PRAKASH, V., Mechanism of solvent induced thermal stabilization of papain, International Journal of Biological Macromolecules, v. 41, p. 383-390, 2007

² SANGEETHA, K.; ABRAHAM, T. E., Chemical modification of papain for use in alkaline medium. Journal of molecular catalysis B: Enzymatic, v. 38, p. 171-177, 2006

³ PINTO, C.A.S.O. Estudo comparativo da estabilidade de formulações cosméticas contendo papaína livre e modificada. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.