

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



EXTRACCION DE LA ENZIMA PAPAINA DEL LATEX DE **Carica papaya**
(PAPAYO) CULTIVADO EN EL PAIS Y SU APLICACIÓN EN CICATRICES
TIPO QUELOIDE Y VERRUGAS

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:
JUAN CARLOS MUNDO ZUNA
DANIEL SERRANO ACOSTA

PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA

SEPTIEMBRE DE 2012

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTROAMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL

DRA. ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

SECRETARIO

LIC. FRANCISCO REMBERTO MIXCO LÓPEZ

COMITE DE TRABAJO DE GRADUACION

COORDINADORA GENERAL:

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo.

ASESORA DE AREA DE ANALISIS DE ALIMENTOS, MICROBIOLOGICO:

MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez.

ASESORA DE AREA DE CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS FARMACÉUTICOS, COSMÉTICOS Y VETERINARIOS:

Licda. Zenia Ivonne Arévalo de Márquez

DOCENTE DIRECTORA:

MSc Sonia Maricela Lemus Martínez

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer primeramente a Dios Todopoderoso por permitirnos poder finalizar este trabajo.

A nuestra estimada docente directora, MSc.Sonia Maricela Lemus Martínez, por su compromiso, dedicación, paciencia y esfuerzo que hicieron posible la culminación de este trabajo.

A la sección de Química Orgánica de la Facultad de Química y Farmacia, por habernos prestado las instalaciones de sus laboratorios, lugar donde se realizó la extracción del látex de las papayas.

A CENSALUD, y especialmente a MSc. Amy Elieth Moran y al laboratorista, el Sr. Juan José por su ayuda en la liofilización del látex de las papayas, así como en la realización de las pruebas de límites microbianos.

Al Laboratorio de Aguas y a la Sección de Química Agrícola Aplicada, por habernos prestado las instalaciones de sus laboratorios para la realización de la determinación de la actividad de la enzima papaína por el método modificado de Kunitz

Al Dr. Carlos Alberto Galdámez por su colaboración en la identificación de las verrugas de los pacientes a los que se les aplicó la enzima papaína.

A los pacientes voluntarios que hicieron posible la aplicación de la enzima y a cualquier otra persona que haya contribuido en la realización de este trabajo. Gracias.

Juan Carlos y Daniel.

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a Dios que me dio la fuerza, la paciencia, la perseverancia y la inteligencia que me permitieron llegar hasta el final de esta carrera.

A mis dos soles, mi padre Juan Jose Mundo, y mi madre Zoila Elizabeth Zuna, por apoyarme y creer en mí, por su cariño y comprensión y por hacer de mi lo que ahora soy y por haberme dejado el mejor legado: La educación.

A mi hermana y hermanos: Xiomara Elizabeth, José Emanuel y Jason Eleazar, por estar siempre a mi lado y darme la seguridad de que nunca caminare solo.

A toda mi familia que siempre me apoyo en todo momento.

A nuestra gran docente directora: MSc. Sonia Maricela Lemus, cuya dedicación y empeño fue determinante para la finalización de este trabajo.

A la constelación de amig@s que siempre me apoyaron, quiero darles las gracias por ser mis amig@s, los cuales son demasiados para dar nombres y apellidos, pero espero que se den por aludidos.

A mi amigo y compañero de tesis Daniel Serrano Acosta pues sin su ayuda y esfuerzo no hubiese sido posible la realización de este trabajo.

Juan Carlos Mundo Zuna

DEDICATORIA

A ti Dios por darme la oportunidad de vivir y estar conmigo en cada paso que doy por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio

A mis amados padres, Noé de Jesús Serrano y Dolores Edelmira Acosta de Serrano por su apoyo en todo momento, sus sacrificios, sus consejos, pero más que nada, por su amor.

A mis hermanos: Cecilia, Juan y Raquel por compartir conmigo tantos lindos momentos y estar siempre conmigo, los amo mucho.

A Evita por brindarme tanto amor y compartir inolvidables momentos en mi vida, te amo mucho y espero seguir cultivando nuestra relación.

A toda mi amada familia por permitirme ser parte de sus vidas y estar conmigo en todo momento, los quiero mucho. A mi tío Víctor Barrera (Q.D.D.G.)

A nuestra docente directora MSc. Sonia Maricela Lemus, por todo su apoyo y por compartir sus conocimientos y su tiempo en innumerables ocasiones.

A todos mis amigos con los que compartimos buenos y malos momentos y que hasta ahora, seguimos siendo amigos. Sin su ayuda y compañía nada de esto hubiese sido posible, especialmente a mi compañero de tesis Juan Carlos Mundo ya que su buena voluntad, su esfuerzo y motivación fueron determinantes en la culminación de este trabajo

Daniel Serrano Acosta

INDICE

	Pág.
Resumen	
CAPÍTULO I	
Introducción	xxviii
CAPITULO II	
2.0 Objetivos	
2.1 Objetivo General	
2.2 Objetivos Específicos	
CAPITULO III	
3.0 Marco Teórico	33
3.1 La piel	33
3.1.1 La epidermis	35
3.1.2 La dermis	37
3.2 Cicatrices	38
3.2.1 Formación de una cicatriz	38
3.2.2 Cicatrización de heridas epidérmicas	39
3.2.3 Cicatrización de heridas profundas	40
3.2.4 Procedimientos que suelen emplearse para reducir las cicatrices	43
3.3 Queloides	44
3.3.1 Cicatrices hipertróficas	46
3.4 Verrugas	46
3.4.1 Tipos de verrugas	48
3.5 Papaya o papayo (<i>Carica papaya</i>)	50

3.5.1	Morfología y taxonomía	51
3.5.2	Composición química	52
3.5.3	Parte medicinal de la planta	53
3.5.4	Propiedades de la papaya	53
3.5.5	Indicaciones farmacológicas de la papaya	53
3.5.6	Toxicidad	55
3.6	Enzimas	55
3.6.1	Generalidades	55
3.6.2	Clasificación	55
3.6.3	Características de la acción enzimática más sobresaliente de algunas enzimas con elevada especificidad	56
3.6.4	Algunos de los efectos que intervienen en la actividad de las enzimas	57
3.7	Enzimas proteolíticas	57
3.7.1	Generalidades	57
3.7.2	Farmacodinamia	57
3.7.3	Usos terapéuticos	58
3.7.4	Reacciones adversas	58
3.7.5	Precauciones y contraindicaciones	58
3.7.6	Interacciones con otras drogas	58
3.8	Enzima papaína	59
3.8.1	Marco histórico	59
3.8.2	Generalidades	59
3.8.3	El látex de la papaya	60
3.8.4	Aplicaciones industriales	61
3.8.5	Aislamiento	62
3.8.6	Propiedades físicas	64
3.8.7	Composición química y estructura	65

3.8.8	Estabilidad	66
3.8.9	Activación de la papaína	68
3.8.10	Sitio Activo	69
3.8.11	Especificidad	69
3.8.12	Tipos de papaína	71
3.8.13	Extracción y recolección del látex	72
3.9	Definición de medición de la actividad proteolítica	73
3.9.1	Método modificado de Kunitz	74
3.9.2	Principio del método	74
3.10	Liofilización	75
3.10.1	Características de la liofilización	75
3.10.2	Etapas de la liofilización	75
3.10.3	El liofilizador	75
3.11	Ensayo de límites microbianos	76
3.11.1	Características de los microorganismos	77
3.11.1.1	<i>Escherichia coli</i>	77
3.11.1.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	77
3.11.1.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	78
3.11.1.4	<i>Salmonella spp</i>	79
3.11.1.5	Hongos	79
3.11.1.6	Levaduras	80

CAPITULO IV

4.0	Diseño Metodológico	84
4.1	Tipo de estudio	84
4.2	Investigación bibliográfica	84
4.3	Universo y muestra	85
4.4	Criterios de selección de los pacientes	85
4.5	Métodos e instrumentos de recolección de datos	86

4.6	Recolección de las muestras, extracción y liofilización del látex	86
4.6.1	Recolección de las muestras	86
4.6.2	Extracción del látex de <i>Carica papaya</i> (papayo) cultivado en el país	86
4.6.3	Liofilización del látex	87
4.7	Determinación de la actividad proteolítica de la enzima papaína liofilizada	88
4.7.1	Ensayo general de la actividad por el método modificado de Kunitz	88
4.7.2	Ensayo de actividad enzimática en relación con el pH	89
4.7.3	Ensayo de la actividad enzimática en relación a la temperatura	90
4.8	Ensayo de límites microbianos	90
4.8.1	Recuento total de microorganismos aerobios (método en placa)	90
4.8.2	Determinación de ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	91
4.8.2.1	Prueba de coagulasa para <i>Staphylococcus aureus</i> .	92
4.8.3	Determinación de ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	93
4.8.4	Determinación de ausencia de <i>Salmonella spp</i>	93
4.8.4.1	Prueba adicional para determinar la ausencia de <i>Salmonella spp</i>	94
4.8.5	Determinación de ausencia de <i>Escherichia coli</i>	95
4.8.5.1	Prueba adicional para determinar la ausencia de <i>Escherichia coli</i>	95

4.8.6	Recuento Total de Hongos y Levaduras (Método en Placa)	96
4.9	Ensayo preclínico de la enzima papaína liofilizada en pacientes	97
4.9.1	Método de aplicación de la enzima papaína liofilizada en cicatrices tipo queloide y verrugas	97
CAPITULO V		
5.0	Resultados	100
5.1	Identificación de la especie vegetal	100
5.2	Recolección y liofilización del látex	100
5.3	Determinación de la actividad proteolítica de la enzima papaína liofilizada por el método modificado de Kunitz.	100
5.3.1	Ensayo de la actividad enzimática en función del pH a temperatura constante de 40 °C	101
5.3.2	Ensayo de la actividad enzimática en función de la temperatura a pH constante de 5.5	102
5.4	Determinación de la calidad microbiológica de la enzima papaína liofilizada	103
5.4.1	Resumen de los resultados de los ensayos de límites microbianos	103
5.4.2	Recuento total de microorganismos aerobios (método en placa)	104
5.4.3	Determinación de ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	104
5.4.4	Determinación de ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	105
5.4.5	Determinación de ausencia <i>Salmonella spp</i>	105
5.4.6	Determinación de ausencia de <i>Escherichia coli</i>	105

5.4.7	Recuento Total de Hongos y Levaduras (Método en Placa)	106
5.5	Aplicación la enzima papaína liofilizada en pacientes seleccionados con cicatrices tipo queloide o verrugas	107
5.5.1	Resultados de la aplicación de la enzima papaína a los pacientes con cicatrices tipo queloide	109
5.5.2	Resumen de los resultados obtenidos luego de las aplicaciones de la enzima papaína en los pacientes	130
5.5.3	Inconvenientes encontrados en las mediciones de las cicatrices tipo queloide	134
5.5.4	Resultados de la aplicación de la enzima papaína a los pacientes con verrugas	135
5.5.5	Resumen de los resultados obtenidos luego de las aplicaciones de la enzima papaína en los pacientes	146
5.5.6	Inconvenientes encontrados en las mediciones de las verrugas	149

CAPITULO VI

6.0 Conclusiones

CAPITULO VII

7.0 Recomendaciones

Bibliografía

Anexos

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

1. Establecimiento donde fueron compradas las papayas.
2. Carta de identificación de muestra botánica.
3. Extracción del látex de las papayas.
4. Liofilización del látex de las papayas.
5. Determinación de la actividad proteolítica de la enzima papaína mediante el método modificado de Kunitz.
6. Determinación de la actividad proteolítica por el método modificado de Kunitz.
7. Cálculos para la determinación de la actividad de la enzima papaína liofilizada.
8. Recuento total de microorganismos aerobios (método en placa).
9. Placas con Medio Agar Digerido de Caseína y Soya para el recuento total de microorganismos aerobios (método en placa).
10. Determinación de ausencia de ***Staphylococcus aureus***.
11. Placas con el Medio Agar Baird-Parker para la determinación de ausencia de ***Staphylococcus aureus***.
12. Determinación de ausencia de ***Pseudomonas aeruginosa***.
13. Placas con el Medio Agar Cetrimida para la determinación de ausencia de ***Pseudomonas aeruginosa***.
14. Determinación de ausencia ***Salmonella spp.***
15. Placas con el Medio Agar XLD y con el Medio Agar Sulfito de Bismuto para la determinación de ausencia de ***salmonella spp.***
16. Determinación de ausencia de ***Escherichia coli***.
17. Placas con el Medio Agar EMB para la determinación de ausencia de ***Escherichia coli***.
18. Recuento total combinado de hongos y levaduras (método en placa).

19. Placas con el Medio Agar Papa Dextrosa para el recuento total combinado de hongos y levaduras (método en placa).
20. Cartas de consentimiento informado firmadas por los pacientes.
21. Cuadro de recolección de datos.
22. Aplicación de la enzima papaína liofilizada.
23. Inserto adjunto del medicamento Contractubex[®].
24. Composición, indicaciones y acción terapéutica del medicamento Callosil[®].
25. Listado de medios de cultivo, materiales equipo y reactivos.
26. Preparación de reactivos.

INDICE DE CUADROS

CUADRO N°	N° pág.
1. Características Morfológicas de <i>Staphylococcus aureus</i> en Medio Agar Selectivo.	92
2. Características Morfológicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en Medio Agar Selectivo.	93
3. Características Morfológicas de <i>Salmonella spp</i> en Medio Agar Selectivo.	94
4. Características Morfológicas de <i>Escherichia coli</i> en Medio Agar Selectivo.	96
5. Resumen de los resultados de los ensayos de limites microbianos.	103
6. Códigos de los pacientes, afección que presentaban y tratamiento aplicado.	107

INDICE DE TABLAS

TABLA N°	N° pág.
1. Características de las enzimas del látex de papaya.	63
2. Propiedades físicas de la papaína.	64
3. Composición en aminoácidos de la papaína.	65
4. Actividad de la enzima papaína liofilizada frente a cambios de pH a temperatura constante de 40 °C.	101
5. Actividad de la enzima papaína liofilizada frente a cambios de temperatura a pH constante de 5.5.	102
6. Resultados de las mediciones de la cicatriz tipo queuloide del paciente PQ01 antes y después de las aplicaciones de la enzima papaína.	110
7. Resultados de las mediciones de la cicatriz tipo queuloide del paciente PQ02 antes y después de las aplicaciones de la enzima papaína.	112
8. Resultados de las mediciones de la cicatriz tipo queuloide del paciente PQ03 antes y después de las aplicaciones de la enzima papaína.	114
9. Resultados de las mediciones de la cicatriz tipo queuloide del paciente PQ04 antes y después de las aplicaciones de la enzima papaína.	116
10. Resultados de las mediciones de la cicatriz tipo queuloide del paciente PQ05 antes y después de las aplicaciones de la enzima papaína.	118
11. Resultados de las mediciones de la cicatriz tipo queuloide del paciente PQ06 antes y después de las aplicaciones de la enzima papaína.	120

12. Resultados de las mediciones de la cicatriz tipo queloide del paciente PQ07 antes y después de las aplicaciones de la enzima papaína.	122
13. Resultados de las mediciones de la cicatriz tipo queloide del paciente PQ08 antes y después de las aplicaciones de la enzima papaína.	124
14. Resultados de las mediciones de la cicatriz tipo queloide del paciente PQ09 antes y después de las aplicaciones de la enzima papaína.	126
15. Resultados de las mediciones de la cicatriz tipo queloide del paciente PQ10 antes y después de las aplicaciones del medicamento Contractubex®.	128
16. Tabla comparativa de los resultados de las mediciones de las cicatrices tipo queloide de los pacientes al inicio y al final del tratamiento.	130
17. Resultado de las mediciones de la verruga del paciente PV01 antes y después de las aplicaciones de la enzima papaína.	136
18. Resultado de las mediciones de la verruga del paciente PV02 antes y después de las aplicaciones de la enzima papaína.	138
19. Resultado de las mediciones de la verruga del paciente PV03 antes y después de las aplicaciones de la enzima papaína.	140
20. Resultado de las mediciones de la verruga del paciente PV04 antes y después de las aplicaciones de la enzima papaína.	142

21. Resultado de las mediciones de la verruga del paciente PV05 antes y después de las aplicaciones del medicamento Callosil®.	144
22. Tabla comparativa de los resultados de las mediciones de las verrugas de los pacientes al inicio y al final del tratamiento.	146

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	N° pág.
1. Tejidos que forman la piel, la epidermis y la dermis epidermis.	33
2. Estratos que conforman la epidermis, de la más profunda a la más superficial, estrato basal, estrato espinoso, estrato granuloso, estrato lucido y estrato corneo.	37
3. Etapas sucesivas del proceso de cicatrización de una herida profunda: 1. Inflamación, 2. Fase migratoria, 3. Fase proliferativa, 4. Fase final.	41
4. Imagen de una cicatriz tipo queloide.	44
5. Imagen de una verruga.	47
6. Árbol, fruto y flor de la papaya.	51
7. Secuencia de aminoácidos de la enzima papaína.	66
8. Triada catalítica de la enzima papaína.	69
9. Grafica de los resultados de la actividad enzimática a diferentes pH a temperatura constante de 40 °C.	101
10. Grafica de los resultados de la actividad enzimática a diferentes temperaturas a pH constante de 5.5.	102
11. Diagrama de localización de las cicatrices y verrugas.	109
12. Dimensiones de la cicatriz tipo queloide del paciente PQ01 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína.	110
13. Fotografías de la cicatriz tipo queloide del paciente PQ01 antes y después del tratamiento y localización de la cicatriz.	111

14. Dimensiones de la cicatriz tipo queloide del paciente PQ02 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína.	112
15. Fotografías de la cicatriz tipo queloide del paciente PQ02 antes y después del tratamiento y localización de la cicatriz.	113
16. Dimensiones de la cicatriz tipo queloide del paciente PQ03 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína.	114
17. Fotografías de la cicatriz tipo queloide del paciente PQ03 antes y después del tratamiento y localización de la cicatriz.	115
18. Dimensiones de la cicatriz tipo queloide del paciente PQ04 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína.	116
19. Fotografías de la cicatriz tipo queloide del paciente PQ04 antes y después del tratamiento y localización de la cicatriz.	117
20. Dimensiones de la cicatriz tipo queloide del paciente PQ05 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína.	118
21. Fotografías de la cicatriz tipo queloide del paciente PQ05 antes y después del tratamiento y localización de la cicatriz.	119
22. Dimensiones de la cicatriz tipo queloide del paciente PQ06 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína.	120

23. Fotografías de la cicatriz tipo queloide del paciente PQ06 antes y después del tratamiento y localización de la cicatriz.	121
24. Dimensiones de la cicatriz tipo queloide del paciente PQ07 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína.	122
25. Fotografías de la cicatriz tipo queloide del paciente PQ07 antes y después del tratamiento y localización de la cicatriz.	123
26. Dimensiones de la cicatriz tipo queloide del paciente PQ08 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína.	124
27. Fotografías de la cicatriz tipo queloide del paciente PQ08 antes y después del tratamiento y localización de la cicatriz.	125
28. Dimensiones de la cicatriz tipo queloide del paciente PQ09 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína.	126
29. Fotografías de la cicatriz tipo queloide del paciente PQ09 antes y después del tratamiento y localización de la cicatriz.	127
30. Dimensiones de la cicatriz tipo queloide del paciente PQ10 antes y después de cada aplicación del medicamento Contractubex®.	128
31. Fotografías de la cicatriz tipo queloide del paciente PQ10 antes y después del tratamiento y localización de la cicatriz.	129

32. Comparación de los delta del largo de las cicatrices tipo queuloide de cada uno de los paciente tratados.	131
33. Comparación de los delta del ancho de las cicatrices tipo queuloide de cada uno de los paciente tratados.	132
34. Comparación de los delta del alto de las cicatrices tipo queuloide de cada uno de los paciente tratados.	133
35. Dimensiones de la verruga del paciente PV01 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína.	136
36. Fotografías de la verruga del paciente PV01 antes y después del tratamiento y localización de la verruga.	137
37. Dimensiones de la verruga del paciente PV02 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína.	138
38. Fotografías de la verruga del paciente PV02 antes y después del tratamiento y localización de la verruga.	139
39. Dimensiones de la verruga del paciente PV03 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína.	140
40. Fotografías de la verruga del paciente PV03 antes y después del tratamiento y localización de la verruga.	141
41. Dimensiones de la verruga del paciente PV04 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína.	142
42. Fotografías de la verruga del paciente PV04 antes y después del tratamiento y localización de la verruga.	143
43. Dimensiones de la verruga del paciente PV05 antes y después de cada aplicación del medicamento Callosil®.	144
44. Fotografías de la verruga del paciente PV05 antes y después del tratamiento y localización de la verruga.	145
45. Comparación de los deltas del largo de las verrugas de cada uno de los pacientes tratados.	147

46. Comparación de los deltas del ancho de las verrugas de cada uno de los pacientes tratados.	148
47. Comparación de los deltas del alto de las verrugas de cada uno de los pacientes tratados.	149

LISTADO DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
°C	Grados Celsius
cm	Centímetro
DH	Grados de dureza
g	Gramo
g/L	Gramos por litro
h	Hora
Kg	Kilogramo
m	Metro
M	Molar
m ²	Metro cuadrado
mL	Mililitro
mm	Milimetro
N	Normal
nm	Nanometro
PQ	Paciente con cicatriz tipo queuloide
PV	Paciente con verruga
UFC/g	Unidades formadoras de colonias por gramo
UV	Ultravioleta

RESUMEN

RESUMEN

Las cicatrices tipo queloides y las verrugas son afecciones muy comunes, si bien estas no representan un problema de salud que ponga en riesgo la vida de las personas, dependiendo de su localización y tipo pueden resultar estéticamente muy desagradables. Los tratamientos para estos padecimientos tales como la cirugía plástica son en ocasiones muy caros y dolorosos.

En la presente investigación se extrajo y liofilizo el látex de *Carica papaya* (papayo) con la finalidad de evaluar su actividad al ser aplicada en cicatrices tipo queloides y verrugas. Una vez obtenida la enzima papaína liofilizada, se procedió a medir su actividad proteolítica mediante el método modificado de Kunitz y evaluar su calidad microbiológica de la enzima papaína liofilizada. Posteriormente se aplicó la enzima papaína liofilizada en las cicatrices tipo queloides de 9 pacientes y en las verrugas de 4 pacientes seleccionados, simultáneamente se aplicó a 1 paciente con cicatriz tipo queloides y a un paciente con verruga un medicamento prototipo para cada una de esas afecciones, con el objetivo de comparar la actividad de la enzima papaína y la de los medicamentos. La actividad proteolítica de la enzima fue evaluada mediante los cambios encontrados en las dimensiones del largo, ancho y alto de la afección y los efectos manifestados por cada paciente.

Al finalizar las aplicaciones se observó una mayor actividad de la enzima papaína que el medicamento prototipo en los pacientes con cicatrices tipo queloides y una actividad similar de la enzima papaína con la del medicamento prototipo en los pacientes con verrugas, por lo cual se recomienda continuar con los estudios clínicos sobre la aplicación de la enzima papaína en cicatrices y verrugas así como en otras afecciones.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

De la naturaleza podemos extraer recursos de gran utilidad, como es el caso del látex del fruto verde de ***Carica papaya*** (papayo) el cual contiene la enzima papaína. A esta enzima se le atribuye una potente acción proteolítica. Se trata de una hidrolasa que actúa a nivel de los enlaces peptídicos de las proteínas. La papaína es actualmente la enzima vegetal con mayor aplicación en la industria; se ha utilizado con mucho éxito en la industria de bebidas principalmente en la elaboración de cerveza, para evitar el enturbiamiento durante el enfriado, en el ablandamiento de carnes y en el tratamiento de aguas residuales, aplicaciones farmacéuticas y otras.

Las cicatrices de tipo queloides y las verrugas son dos tipos de afecciones comunes de la piel que son ocasionadas por diversas causas como lesiones químicas o mecánicas en el caso de las cicatrices tipo queleide, y por el virus del papiloma humano en el caso de las verrugas.

En el presente trabajo de investigación se extrajo el látex de papayos verdes cultivadas en el país, posteriormente se procedió a liofilizar el látex, obteniendo así la enzima papaína liofilizada. Luego se determinó la actividad proteolítica de la enzima por el método modificado de Kunitz y se evaluó su calidad microbiológica mediante pruebas de límites microbianos, dichas determinaciones fueron realizadas en los Laboratorios de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador y en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD)

Posteriormente se prosiguió con aplicación de la enzima papaína en 9 pacientes con cicatrices tipo queloides y en 4 pacientes con verrugas, a la vez

se aplicó en un paciente con cicatriz tipo queuloide el medicamento Contractubex[®] (Extracto cepae, heparina sódica y alantoina) y en un paciente con verruga el medicamento Callosil[®] (Ácido salicílico), para establecer una comparación entre la actividad de la enzima papaína con respecto a la de los medicamentos prototipo para las cicatrices tipo queuloide y las verrugas. La actividad de la enzima se evidencio mediante las disminuciones de las dimensiones del largo ancho y alto de la cicatriz tipo queuloide o de la verruga. Las aplicaciones se realizaron una vez por semana durante un mes durante los meses de enero del 2011 a febrero del 2012.

Al final del tratamiento la enzima papaína liofilizada presento una actividad superior a la observada por parte del medicamento ensayado y patentado en el tratamiento de cicatrices tipo queuloide Contractubex[®] y una actividad similar y equiparable a la del medicamento ensayado y patentado en el tratamiento de verrugas Callosil[®].

CAPITULO II
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Extraer la enzima papaína a partir del látex de *Carica papaya* (papayo) cultivado en el país y su aplicación en el tratamiento de cicatrices tipo queloides y verrugas.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 2.2.1 Identificar la especie vegetal seleccionada (*Carica papaya*).
- 2.2.2 Recolectar el látex del papayo (*Carica papaya*).
- 2.2.3 Liofilizar el látex, para obtener la enzima papaína.
- 2.2.4 Medir la actividad proteolítica de la enzima papaína liofilizada utilizando el método modificado de Kunitz.
- 2.2.5 Determinar la calidad microbiológica de la enzima papaína liofilizada.
- 2.2.6 Aplicar la enzima papaína liofilizada en pacientes seleccionados con cicatrices tipo queleide o verrugas y evaluar la eficacia del tratamiento después de cada aplicación.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 LA PIEL. ⁽²³⁾

La piel es un órgano ya que está formado por distintos tejidos que se unen para llevar a cabo actividades específicas. Es uno de los órganos más grandes del cuerpo, tanto en superficie como en peso. En adultos, la piel cubre un área de alrededor de 2 m² y pesa entre 4,5 y 5 kg. Su grosor oscila entre 0,5 y 4 mm, dependiendo de su localización.

Estructuralmente, la piel consta de dos partes principales. La porción más externa y fina, formada por epitelio, recibe el nombre de epidermis y esta a su vez se encuentra unida a una capa más gruesa e interna, compuesta por tejido conjuntivo llamada dermis.

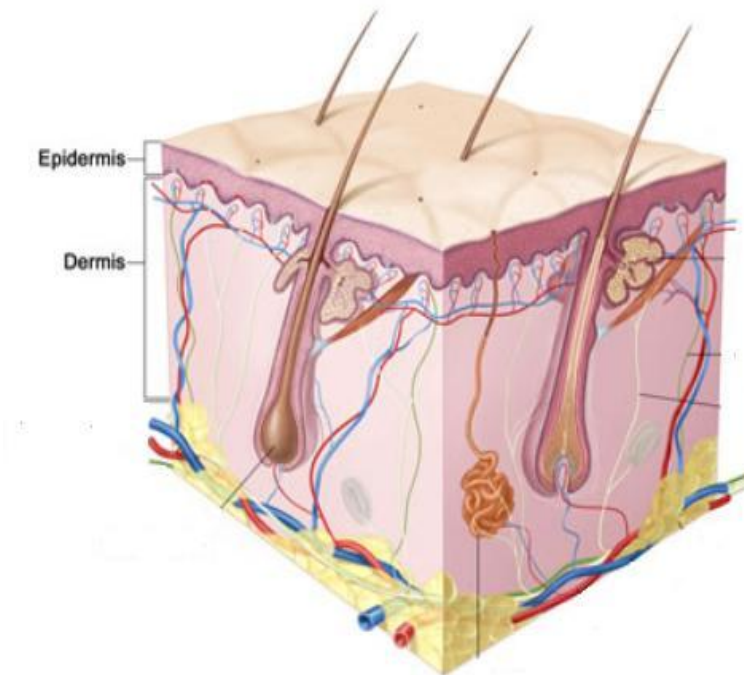


Figura N° 1. Tejidos que forman la piel, la epidermis y la dermis.

La piel desarrolla varias funciones:

- **Regulación de la temperatura corporal:** Como repuesta a una alta temperatura ambiente o a un ejercicio energético, la evaporación del sudor sobre la superficie cutánea ayuda a devolver a la normalidad una temperatura corporal elevada. En respuesta a una baja temperatura, disminuye la producción de sudor, lo que ayuda a conservar el calor.

- **Protección:** La piel cubre al organismo y proporciona una barrera física que protege a los tejidos subyacentes de la abrasión física, la invasión bacteriana, la deshidratación y la radiación ultravioleta.

- **Sensibilidad:** La piel contiene abundantes terminaciones nerviosas y receptoras que detectan los estímulos relacionados con la temperatura, el tacto, la presión y el dolor.

- **Excreción:** Además de eliminar el calor y una cantidad de agua del organismo, el sudor es el vehículo para la excreción de pequeñas cantidades de sales y de varios compuestos orgánicos.

- **Inmunidad:** Determinadas células de la epidermis son componentes importantes del sistema inmune, que mantiene alejados a los invasores extraños.

- **Reservorio de sangre:** La dermis alberga una amplia red de vasos sanguíneos en los que se encuentra entre el 8% y el 10% de la sangre total del adulto en reposo.

- **Síntesis de vitamina D:** La síntesis de esta es iniciada con la activación por parte de los rayos ultravioleta de la luz solar de una molécula precursora existente en la piel.

3.1.1 La epidermis. ⁽²³⁾

La epidermis está formada por epitelio escamoso estratificado y contiene cuatro tipos principales de células. Alrededor del 90% de las células epidérmicas son queratinocitos producen la proteína queratina, que ayuda a impermeabilizar y proteger la piel y los tejidos subyacentes. Los melanocitos que producen el pigmento melanina, representan alrededor del 8% de las células epidérmicas. El tercer tipo celular de la epidermis es conocido como células de Langerhans; estas células se originan en la médula ósea y emigran hasta la epidermis. El cuarto tipo de células que se encuentran en la epidermis son las denominadas células de Merkel, localizadas en las capas más profundas de la epidermis.

La epidermis está formada por cuatro o cinco capas de células. En la mayoría de las regiones del organismo, la epidermis tiene un grosor de alrededor de 0.1 mm y cuatro capas. En las zonas en las que la exposición a la fricción es mayor, como sucede en las palmas de las manos y en las plantas de los pies, la epidermis es más gruesa (1 a 2 mm) y tiene cinco capas. La exposición constante de la piel fina o gruesa a la presión o a la fricción estimula la formación de un callo o engrosamiento anormal de la epidermis.

Los nombres de las cinco capas (estratos), desde la más profunda a la más superficial, son:

- **Estrato basal:** Esta capa única de células cubicas o cilíndricas contiene a las células precursoras de una división continuada y a los melanocitos. Las

células precursoras se multiplican y producen queratinocitos, que migran a la superficie y entran a formar parte de las capas más superficiales. El núcleo de los queratinocitos degenera y las células mueren y acaban descamándose en la capa más superficial de la epidermis. Otras células precursoras del estado basal emigran hacia la dermis y forman las glándulas sudoríparas, sebáceas y los folículos pilosos. Contiene también los discos táctiles (Merkel) sensibles al tacto.

- **Estrato espinoso:** Esta capa de la epidermis contiene de 8 a 10 hileras de células poliédricas (con muchas caras) que se mantienen íntimamente unidas adaptándose entre ellas. Estas células parecen estar cubiertas por espigas (de ahí el nombre espinoso). En cada proyección en forma de espina, los filamentos de citosqueleto se introducen en los desmosomas que mantienen estrechamente unidas a las células. Entre los queratinocitos se encuentran largas proyecciones de los melanocitos, de las que aquellos toman la melanina mediante fagocitosis.

- **Estrato granuloso:** La tercera capa de la epidermis está formada por tres a cinco hileras de células aplanadas que desarrollan gránulos que se tiñen intensamente de una sustancia llamada queratohialina, que es la precursora de la queratina, una proteína que se encuentra en la parte externa de la epidermis. La queratina forma una barrera que protege a las capas más profundas de las lesiones y de la invasión bacteriana, a la vez que impermeabiliza la piel. Los núcleos de las células del estrato granuloso se encuentran en diversos estadios de degeneración. A medida que se degradan, las células dejan de desarrollar las actividades metabólicas vitales y acaban muriendo.

- **Estrato lúcido:** Normalmente, solo la piel gruesa de las palmas de las manos y de las plantas de los pies tienen esta capa. Está formada por tres a

cinco hileras de células planas, claras y muertas que contienen algunas gotitas de una sustancia intermedia formada a partir de la queratohialina y que acaba por ser transformada en queratina.

- **Estrato córneo:** Esta capa está formada por 25 a 30 hileras de células planas y muertas, completamente ocupadas por queratina. Estas células están descamándose continuamente y son sustituidas por otras procedentes de estratos más profundos. El estrato córneo actúa como una eficaz barrera frente a las ondas lumínicas y caloríficas, las bacterias y muchas sustancias químicas.

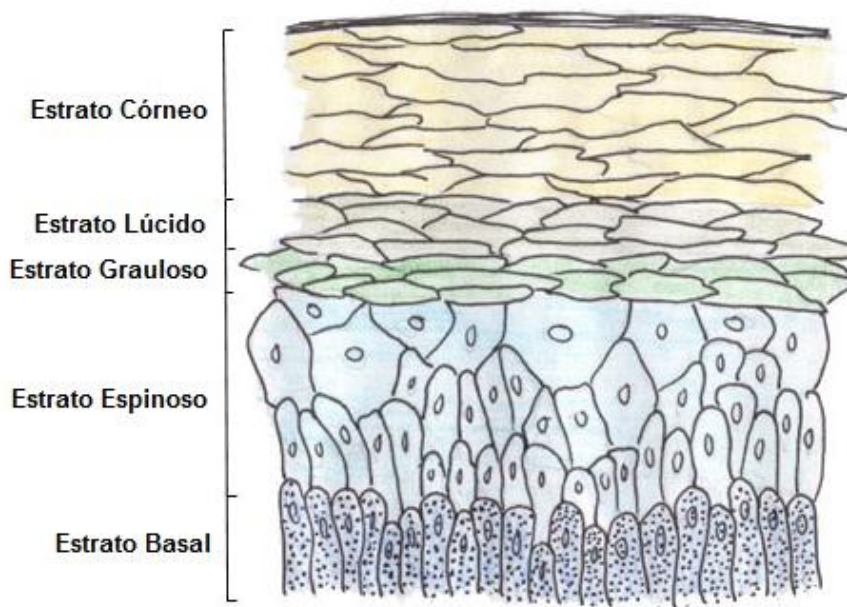


Figura N° 2. Estratos que conforman la epidermis, de la más profunda a la más superficial, estrato basal, estrato espinoso, estrato granuloso, estrato lúcido y estrato córneo.

3.1.2 La dermis.

La segunda porción fundamental de la piel, la dermis, está formada por tejido conjuntivo que contiene colágeno y fibras elásticas. Las pocas células de la dermis son fibroblastos, macrófagos y adipocitos. La dermis es muy gruesa en

las palmas y las plantas y muy fina en los párpados, el pene y el escroto. También tiende a ser más gruesa en la cara dorsal que en la cara ventral del cuerpo y más en las zonas externas que en las internas de las extremidades. Los vasos sanguíneos, los nervios, las glándulas y los folículos pilosos se encuentran inmersos en la dermis.

La porción más externa de la dermis, alrededor de la quinta parte del grosor total de la capa, recibe el nombre de región papilar. Está formada por tejido conjuntivo areolar que contiene finas fibras elásticas.

La porción más profunda de la dermis es la región reticular. Está compuesta por un tejido conjuntivo denso e irregular formada por haces entrecruzados de gruesas fibras colágenas y elásticas. En el interior de la región reticular los haces de fibras de colágeno se entrelazan a manera de una red. Los espacios entre las fibras están ocupados por una pequeña cantidad de tejido adiposo, folículos pilosos, nervios, glándulas sebáceas y los conductos de las glándulas sudoríparas. El grosor variable de la región reticular justifica parcialmente las diferencias de grosor del resto de la piel. La combinación de fibras elásticas y colágenas de la región reticular proporciona a la piel su fuerza, su extensibilidad y su elasticidad.

3.2 CICATRICES. ⁽²³⁾

3.2.1 Formación de una cicatriz.

Un trauma a la piel por golpe, herida punzante, quemadura o cirugía causa una herida, en respuesta a la lesión la piel se cura a si misma formando un tejido cicatricial. Mientras más severa la herida, más complicada la cicatrización.

3.2.2 Cicatrización de las heridas epidérmicas.

La situación expuesta de la piel la hace vulnerable a los traumatismos provocados por estímulos físicos o químicos. Un tipo frecuente de herida epidérmica es la abrasión (zona de raspadura), como el que se puede experimentar en un despellejamiento de las rodillas o los codos. Otro tipo son las quemaduras de primer y segundo grado. En la herida epidérmica la porción central de la herida puede afectar a la dermis, mientras que en los bordes solo se produce un daño ligero de las células epidérmicas superficiales.

En respuesta a la lesión, las células epidérmicas basales de la zona de la herida pierden su contacto con la membrana basal. Estas células aumentan de tamaño y emigran a través de la herida. Parecen hacerlo en forma de sabana, hasta que las más adelantadas se encuentran con las que proceden del otro extremo de la herida. Cuando las células epidérmicas entran en contacto se detiene la emigración mediante una inhibición por contacto. Según este fenómeno, cuando una célula epidérmica encuentra a otra, cambia la dirección de su movimiento hasta que encuentra a una nueva célula similar, y así sucesivamente. La emigración se detiene por fin cuando todas las células epidérmicas están en contacto unas con otras. La inhibición por contacto solo parece ocurrir entre células similares; en otras palabras, no se produce entre células epidérmicas y otros tipos de células. Las células malignas no siguen las reglas de la inhibición por contacto, por lo que conservan su capacidad para invadir los tejidos vecinos con escasas limitaciones.

De manera simultánea a la emigración de algunas células epidérmicas basales, las células precursoras basales que permanecen en su lugar se dividen para sustituir a las que han emigrado. La emigración persiste hasta que la herida está de nuevo cubierta. A continuación, las células emigrantes se dividen para formar nuevos estratos, con lo que la nueva epidermis va engrosándose. Los

acontecimientos implicados en la cicatrización de heridas epidérmicas se producen en las 24 a 48 horas siguientes a la lesión.

El factor de crecimiento epidérmico (FCE) es una hormona proteica que aparece de forma natural en las heridas y que estimula el crecimiento de las células epidérmicas y los fibroblastos.

3.2.3 Cicatrización de las heridas profundas.

Cuando una lesión afecta a tejidos más profundos que la epidermis, el proceso de reparación es más complejo que el de la cicatrización epidérmica y se traduce en la formación de cicatrices.

El primer paso de la cicatrización de heridas profundas consiste en una inflamación, es decir, una respuesta vascular y celular que sirve para eliminar microbios, materiales extraños y tejidos muertos, preparando a la herida para la reparación. Durante la fase inflamatoria se forma un coágulo sanguíneo en la herida que mantiene unidos, aunque de forma laxa, los bordes de la misma. La vasodilatación y el aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos estimulan la salida de leucocitos llamados neutrofilos y monocitos (macrófagos) que fagocitan microbios, y de las células mesenquimales que se desarrollan a fibroblastos.

En la siguiente fase, la fase migratoria, el coagulo se convierte en una costra y las células epiteliales emigran por debajo de ella para cubrir la herida. Los fibroblastos emigran a lo largo de ovillos de fibrina y comienzan a sintetizar tejido cicatricial (fibras de colágeno y glucoproteínas) y los vasos sanguíneos lesionados inician un nuevo crecimiento. En esta fase, el tejido que ocupa la herida recibe el nombre de tejido de granulación.

La fase proliferativa se caracteriza por una gran proliferación de células epiteliales debajo de la costra, el depósito por los fibroblastos de fibras de colágeno según un patrón aleatorio y el mantenimiento del crecimiento de los vasos sanguíneos.

En la fase final, la fase de maduración, la costra se desprende cuando la epidermis ha recuperado su grosor normal. Las fibras de colágeno comienzan a organizarse, los fibroblastos disminuyen su número y los vasos sanguíneos recuperan la normalidad.

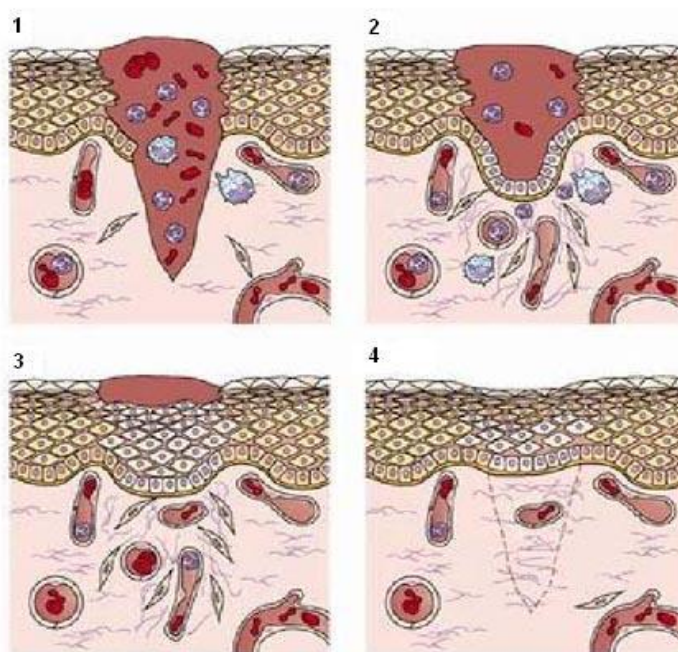


Figura N° 3. Etapas sucesivas del proceso de cicatrización de una herida profunda: 1. Inflamación, 2. Fase migratoria, 3. Fase proliferativa, 4. Fase final.

El proceso de formación de tejido cicatricial recibe el nombre de fibrosis. A veces se forma una gran cantidad de tejido, lo que da lugar a una cicatriz sobre elevada, es decir, que sobresale por encima de la superficie normal de la epidermis. Estas cicatrices pueden limitarse a los bordes de la herida original

(cicatriz hipertrófica) o extenderse más allá, afectando a los tejidos adyacentes normales (queloide).

El tejido cicatricial difiere de la piel normal en que sus fibras de colágeno se disponen de una manera más densa. Además, tienen menos vasos sanguíneos y puede carecer de pelos, glándulas cutáneas o neuronas sensitivas.

La forma en que una cicatriz, evoluciona depende mucho de la manera en que el cuerpo responde al trauma inicial. Los factores que afectan la severidad o apariencia de una cicatriz incluyen el tamaño, profundidad, localización de la herida, la edad del paciente, salud general, herencia, grosor, color de la piel y el aporte sanguíneo del área.

Una cicatriz puede llegar a preocupar grandemente a una persona, por pequeña que sea esta puede afectar de tal manera que influya en el desarrollo normal de su vida diaria.

A una herida le toma un año o más cicatrizar completamente por lo que en muchos pacientes se espera este periodo para iniciar tratamiento, sin embargo en casos especiales algunas cicatrices responden más efectivamente cuando se tratan entre los 6 y 8 meses. Es importante recordar que las cicatrices nunca pueden ser removidas completamente, pero muchas pueden llegar a mejorar grandemente. Los diferentes tipos de cicatrices responden de manera individual a las diferentes formas de tratamiento.

El procedimiento dermatológico específico para reducir una cicatriz será determinado por su médico basándose en lo siguiente:

- Edad, estado general de salud e historia médica.
- Severidad de la cicatriz.

- Tipo de cicatriz.
- Tolerancia a ciertos medicamentos, procedimientos o terapias.
- Expectativas para la trayectoria de la condición.
- Opinión o preferencia.

Las cicatrices suelen desaparecer con el tiempo. Mientras se curan, se puede utilizar maquillaje para cubrir las. Existen determinadas técnicas dermatológicas que ayudan a hacer menos visibles las cicatriz, pero no la borra por completo.

3.2.4 Procedimientos que se suelen emplear para reducir las cicatrices. ⁽⁶⁾

- **Dermoabrasión:** La dermoabrasión puede utilizarse para reducir al mínimo cicatrices pequeñas, irregularidades menores en la superficie de la piel, cicatrices quirúrgicas y cicatrices por acné. Como su nombre lo sugiere, consiste en eliminar las capas superiores de la piel mediante un aparato eléctrico que raspa la piel. Cuando la piel se cura, la superficie tiene una apariencia más fresca y suave.
- **Exfoliación química:** La exfoliación química se realiza con frecuencia para tratar las pieles dañadas por el sol, con pigmentación irregular y cicatrices superficiales. Consiste en desprender la capa superior de la piel mediante la aplicación de un producto químico. Al retirar la capa superior, la piel se regenera; en general, la apariencia de la piel mejora.
- **Inyecciones de colágeno:** Un tipo de colágeno, que se deriva del colágeno bovino purificado, se inyecta bajo la piel para reemplazar el colágeno natural del cuerpo que se ha perdido. El colágeno que se puede inyectar se utiliza generalmente como tratamiento contra las arrugas, las cicatrices y las líneas.

3.3 QUELOIDES. ⁽⁶⁾

Agrupaciones irregulares, redondeadas y gruesas de tejido cicatricial que se forman en la zona de la herida, pero que no coincide con los bordes de esa herida. A menudo son de color rojo o más oscuro, en comparación con la piel normal circundante lo que las hace estéticamente desagradables. Los queloides se forman con el colágeno que el cuerpo produce después que ha sanado una herida. Estas cicatrices pueden aparecer en cualquier parte del cuerpo. Se producen con mayor frecuencia en las personas de piel más oscura. Las cicatrices queloides pueden aparecer hasta un año después del traumatismo original en la piel.

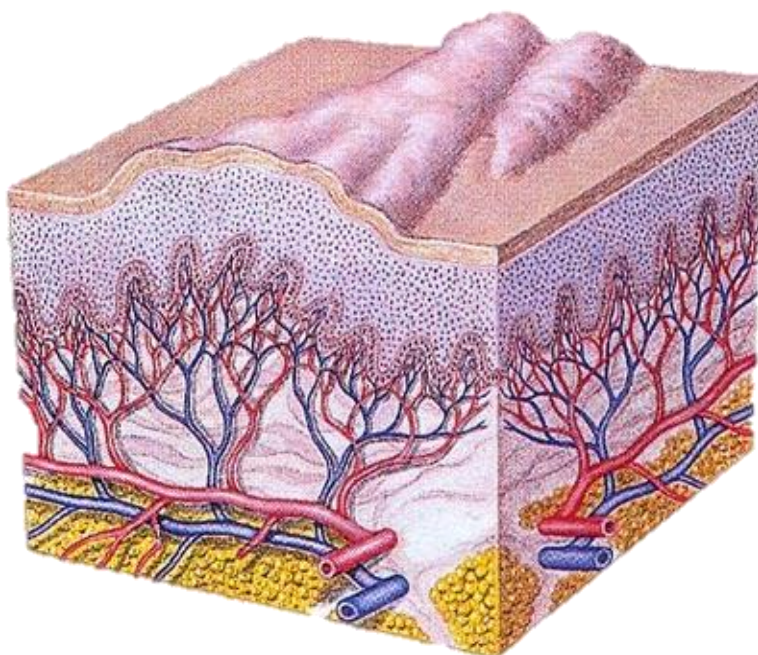


Figura N° 4. Imagen de una cicatriz tipo queloide.

El tratamiento de las cicatrices queloides varía. No hay una cura simple para las cicatrices queloides. El tratamiento puede incluir los siguientes:

- **Inyecciones de esteroides:** Los esteroides se inyectan diariamente en el tejido cicatricial para ayudar a disminuir la irritación, el enrojecimiento y las sensaciones de quemazón que estas cicatrices pueden producir.
- **Crioterapia:** La crioterapia consiste en quitar la cicatriz congelándola mediante la aplicación de un medicamento.
- **Terapia de presión:** La terapia de presión requiere la utilización de un dispositivo de presión que se aplica sobre la zona de la cicatriz. Puede utilizarse día y noche durante un periodo de 4 a 6 semanas.
- **Cirugía:** Si la cicatriz queloide no responde a las opciones de tratamiento no quirúrgicas, es posible recurrir a la cirugía. Un tipo de cirugía consiste en eliminar directamente la formación de la cicatriz con una incisión; luego, se colocan puntos de sutura para ayudar a cerrar la herida. Algunas veces se utilizan injertos de piel para que la herida cierre. Esto implica reemplazar o ajustar la piel en las zonas que no la tienen. Los injertos de piel se realizan tomando un pedazo de piel sana de otra zona del cuerpo (llamada zona donante) y colocarla en la zona que carece de piel.

Otra opción es la cirugía láser. Las cicatrices pueden tratarse con una variedad de laser diferentes según cuál sea la causa de la herida. Los rayos laser se emplean con distintos fines: alisar una cicatriz, eliminar su color anormal o aplanarla. En la mayoría de los casos, la terapia con láser en las cicatrices se realiza conjuntamente con otros tratamientos, entre los que se incluyen inyecciones de esteroides, el uso de apósitos especiales y el uso de vendas. Pueden ser necesarios múltiples tratamientos, sin importar el tipo inicial de terapia.

3.3.1 Cicatrices hipertróficas.

Similares a las cicatrices queloides; sin embargo su crecimiento está confinado a los bordes de la herida. Estas cicatrices pueden también tener una apariencia rojiza, y suelen ser gruesas y elevadas. Las cicatrices hipertróficas normalmente empiezan a desarrollarse semanas después de la lesión en la piel. Pueden mejorar de forma natural, aunque este proceso puede tomar hasta un año o más.

En el tratamiento de estas cicatrices, los esteroides ocupan un lugar destacado, aunque no hay una única terapia para todos los casos. Los esteroides se pueden administrar mediante una inyección o una aplicación directa. Estas cicatrices pueden también quitarse quirúrgicamente. A menudo, las inyecciones de esteroides se utilizan junto con la cirugía; las aplicaciones pueden continuar hasta dos años después de la cirugía para aumentar la probabilidad de curación y disminuir la probabilidad de que la cicatriz vuelva a aparecer.

3.4 VERRUGAS. ⁽⁵⁾

Tumores epiteliales frecuentes, contagiosos, causados por lo menos por 60 tipos de virus del papiloma humano (VPH), algunos de los cuales pueden ser malignos. Las verrugas víricas pueden aparecer a cualquier edad, pero son más frecuentes en los niños mayores y raras en los ancianos. El aspecto y tamaño dependen de la localización y del grado de irritación y traumatismo al que están sometidas. El curso es variable. La infección puede persistir como una lesión única o como múltiples lesiones, que pueden desarrollarse por autoinoculación.

Es habitual la regresión completa después de varios meses, con tratamiento o sin él, pero las verrugas pueden persistir durante años y recidivar en el mismo sitio o en otras localizaciones.

No está clara todavía la importancia relativa de la inmunidad humoral ni celular. Algunos autores piensan que las partículas víricas, al hallarse solo en la zona más externa del epitelio (estrato granuloso y debajo de este), tiene pocas oportunidades de llegar a una profundidad suficiente para actuar como antígenos efectivos. Por otra parte, los pacientes con inmunosupresión por trasplante de órganos o por otras causas, carecen de inmunidad ante el virus y adquieren infecciones cutáneas generalizadas con muchos tipos de virus.

Este hecho sugiere que determinados tipos de mecanismos inmunes tienen importancia. Además, la desaparición espontánea de muchas verrugas en personas normales y la aparente inmunidad que se adquiere de por vida requieren una explicación adicional.



Figura N° 5. Imagen de una verruga.

3.4.1 Tipos de verrugas.

- **Verrugas vulgares:** (Verrucae vulgaris) son casi universales en su distribución. Son tumores bien delimitados, de superficie rugosa, redondos o irregulares, duros, de color gris claro, amarillo, pardo o negro-grisáceo, de 2-10 mm de diámetro. Aparecen con mayor frecuencia en zonas sometidas a traumatismos (por ejemplo, dedos, codos, rodillas, cara, cuero cabelludo), pero pueden extenderse a cualquier otra región. Las verrugas periungueales son verrugas vulgares que aparecen en la región de la lámina ungueal.

- **Verrugas plantares:** Son verrugas vulgares en la planta del pie; son aplanadas por la presión y están rodeadas de epitelio cornificado. Pueden ser muy sensibles y se distinguen de los callos por su tendencia a hemorragias puntiformes cuando se corta su superficie. Las verrugas en mosaico son placas de miles de verrugas plantares muy juntas.

- **Verrugas filiformes:** Son pequeñas excrecencias largas y estrechas que suelen observarse en párpados, cara, cuello o labios. Las verrugas planas (lesiones lisas, planas, amarillo parduscas) aparecen más frecuentemente en los niños y adultos jóvenes, sobre todo en la cara y a lo largo de las marcas de rascado por autoinoculación.

- **Verrugas venéreas:** Estas son causadas por papiloma virus y en general se transmiten por contagio sexual. Su periodo de incubación oscila entre 1 y 6 meses; se localizan preferentemente en las superficies calientes y húmedas de la zona subprepuccial, en el surco coronal, dentro del meato uretral y sobre el cuerpo del pene en los varones, y en la vulva, la pared vaginal, el cuello del útero y la región perineal en las mujeres. En los varones homosexuales se localizan sobre todo en la región perianal y en el recto. Las verrugas genitales suelen manifestarse en forma de diminutos tumores blandos, húmedos,

eritematosos o rosáceos, que experimentan un rápido crecimiento, pudiendo adoptar el aspecto de una masa pedunculada. En general se observan lesiones con un típico aspecto a coliflor en la misma zona.

El tratamiento depende de la localización, del tipo, de la extensión y de la duración de las lesiones, así como la edad del paciente, su estado inmunológico y su deseo de que estas sean tratadas.

La mayoría de las verrugas vulgares desaparecen espontáneamente en menos de dos años con un tratamiento sencillo que no deja cicatriz, como el colodión elástico que contiene ácido salicílico al 17% y ácido láctico al 17% aplicado a diario, después de raspado suave por el paciente o por uno de los padres. El médico puede congelar la verruga (respetando la piel circundante) durante 15-30 segundos con Nitrógeno líquido. Este procedimiento suele ser curativo, pero es posible que sea necesario repetirlo al cabo de 2-3 semanas.

La electrocoagulación con legrado es satisfactoria para una lesión solitaria o para pocas lesiones, pero puede dejar cicatriz. La aparición de nuevas verrugas en zonas próximas ocurre en el 35% de los pacientes dentro del año siguiente a cualquier tratamiento, por lo que, en lo posible, deberían evitarse los métodos que dejan cicatriz.

Las verrugas plantares pueden necesitar una maceración más vigorosa con un vendaje que contenga ácido salicílico al 40% mantenido durante varios días. El médico retira después la verruga desbridándola mientras aun esta blanda y húmeda; a continuación se realiza la destrucción mediante congelación o cáusticos.

Otros tratamientos destructivos (como el láser de CO₂ o varios ácidos) son útiles en muchos casos; puede ser suficiente incluso recortar las verrugas filiformes.

La radioterapia no se emplea en el tratamiento de las verrugas debido a que estas se vuelven mucho más invasivas. La exposición a los rayos ultravioletas también es un potente cocarcinogeno en los pacientes con epidermodisplasia verruciforme o inmunosupresión de cualquier causa.

Las verrugas planas pueden tratarse a menudo con éxito mediante la aplicación diaria de ácido retinoico al 0,05%. Si la exfoliación no ha sido suficiente para que desaparezcan las verrugas, puede aplicarse otro irritante a continuación (como el peróxido de benzoilo al 5%) o una crema con ácido salicílico al 5%.

Las verrugas genitales pueden eliminarse por electrocauterización, laser, crioterapia o exéresis quirúrgica bajo anestesia local o general. A menudo se utilizan las aplicaciones tópicas de podofilina o de ácido tricloroacético, pero este tipo de tratamiento requiere aplicaciones repetidas del fármaco, durante semanas o meses, y con frecuencia es ineficaz.

3.5 PAPAYA O PAPAYO (*Carica papaya*). ⁽⁴⁾

La papaya (***Carica papaya***) pertenece a la familia de la Caricácea, nativa de Centroamérica. La primera mención de la misma fue en el año 1535 y se le atribuye a Oviedo (Gonzalo Fernández de Oviedo y Valdéz 1478-1557, Historiador Español), quien informo a los Reyes de España haber visto plantas de papaya creciendo en dicha región bajo el nombre de Olocoton₍₁₎.

Su llegada del Caribe a Sudamérica se dio a los marinos españoles y portugueses. En estos lugares se le conoce con diferentes nombres como: Fruta bomba, lechosa, paw-paw, papay, put. Su distribución en todo el resto del mundo tropical se logra durante el siglo XVI.



Figura N°6. Árbol, fruto y flor de la papaya.

3.5.1 Morfología y taxonomía.

- **Familia:** *Caricáceas*
- **Orden:** Parietales
- **Especie:** *Carica papaya*
- **Origen:** América Central. Actualmente se cultiva en Florida, Hawái, África Oriental Británica, Sudáfrica, Ceilán, India, Islas Canarias, Archipiélago Malayo y Australia.

- **Planta:** Hierba arborescente de crecimiento rápido, de corta vida, de tallo sencillo o algunas veces ramificado, de 2-10 m de altura, con el tronco recto, cilíndrico, suave, esponjoso-fibroso suelto, jugoso, hueco, de color gris o café grisáceo, de 10-30 cm de diámetro y endurecido por la presencia de cicatrices grandes y prominentes causadas por la caída de hojas e inflorescencias.

- **Sistema radicular:** Muy superficial, lo que condiciona el laboreo del terreno.

- **Hojas:** De color verde oscuras y gruesas, de unos 80 cm de longitud, alternas y muy juntas entre sí, palmeadas y divididas de forma suborbicular en 5-7 lóbulos, irregulares. Posee un peciolo robusto de hasta 50 cm de longitud.

- **Flores:** Dioicas, aunque raramente monoica, agrupadas en el extremo del tronco, de color amarillo claro. Posee 5 pétalos y 5 sépalos del mismo color. Las flores masculinas son fragantes las cuales nacen de racimos pedunculados de hasta 50 cm de longitud. Las flores femeninas son de mayor tamaño, solitarias, axilares y con pedúnculo corto.

- **Frutos:** Son gratos al paladar, vallas carnosas y lobulosas, usualmente con 5 ángulos de tamaño variable y de color anaranjado al madurar. Contiene en su interior una pulpa lechosa de color anaranjado, con numerosas semillas negras y globulares que están dispuestas en su cavidad central. Las semillas son aplanadas y con endospermo carnosos.

3.5.2 Composición química.

El látex del fruto contiene enzimas proteolíticas: papaína, quimiopapaína y lizosima, además contiene ácidos orgánicos, carotenoides, vitamina A, C y E y

sales minerales como potasio. Las hojas maduras contienen un alcaloide llamado carpaina, que se deshace con el calor. La semilla contiene tropacolina, mirocina, caricina y carpasemina, ácido málico, pepsina, pancreatina. ⁽¹⁾

3.5.3 Parte medicinal de la papaya. ⁽¹⁷⁾

El látex desecado del fruto, el cual se puede obtener de los frutos y de la planta entera.

3.5.4 Propiedades de la papaya.

- Digestiva
- Activadora de los jugos pancreáticos
- Anticonceptiva (a grandes dosis)
- Vermífugo
- Cicatrizante

3.5.5 Indicaciones farmacológicas de la papaya. ⁽¹¹⁾

- **Sistema digestivo:** Su jugo posee la característica de ablandar las carnes, debido a su alto contenido en papaína, la cual es capaz de disolver los trombos de fibrina y ejerce una actividad peptónica muy superior a la de la propia pepsina digestiva. La papaína y la pulpa de la papaya se recomiendan en casos de dispepsia y dificultad de digestión de origen intestinal, especialmente cuando existe una disminución en la secreción de jugos pancreáticos. La papaya está muy recomendada en aquellas personas que tienen dificultad en digerir las proteínas o las grasas. Así mismo está muy indicada como postre en aquellas comidas en las cuales ha habido una sobrecarga proteica.

- **Estreñimiento:** Tomar en ayunas una papaya con un poca de sal.

- **Endocrinología:** La virtud de la papaya como anticonceptivo es algo discutido, se sabe por ejemplo que las mujeres indias que consumen este fruto en gran cantidad poseen una menor capacidad productiva. Esta acción se debe probablemente a una inhibición de la hormona progesterona. Las semillas de la papaya son oxitólicas, es decir que estimulan la contracción uterina.

- **Infestación intestinal:** Por *Áscaris lumbricoides* y Tenia.

- **Lombrices intestinales:** Ingerir una cucharada de las semillas frescas y molidas, puede mezclarse las semillas con alguna infusión que tomemos habitualmente.

- **Inflamaciones del hígado, riñones y ovarios:** El fruto maduro y rayado o licuado mezclado con leche o agua.

- **Enteritis de los niños:** Cocimiento de una rodaja verde, pelada y sin semillas en un litro de agua. Añadir luego leche.

- **Dermatología:** Debido a su capacidad de disolver proteínas, su uso es recomendado en los casos de verrugas, úlceras córneas y excrecencias de todo tipo como eczemas descamativos, psoriasis, etc. En los abscesos se utiliza el látex de papaya, el cual además de ayudar en la cicatrización, disuelve el tejido colágeno que obstruye en muchos casos la cicatrización correcta.

- **Otorrinolaringología:** La papaya se utiliza en la disolución de los tapones de cerumen de los oídos.

- **Asma, fiebre y enfermedades pulmonares:** Cocimiento de un pedazo de la hoja (del tamaño de un billete para un jarro de agua).
- **Para mujeres que amamantan a sus niños:** El jugo lechoso de la papaya verde, untado en los pechos de las mujeres que dan de mamar a sus hijos aumenta la secreción láctea.

3.5.6 Toxicidad. ⁽⁴⁾

La leche aplicada prolongadamente puede causar irritación grave. El exceso de uso de semilla puede ser abortivo. La ingestión del látex puede causar gastritis, mucha papaína puede causar enfisema pulmonar en animales de experimentación.

3.6 ENZIMAS.

3.6.1 Generalidades.

Las enzimas son catalizadores muy potentes y eficaces, químicamente son proteínas. Como catalizadores las enzimas actúan en pequeñas cantidades y se recuperan indefinidamente, estas no llevan a cabo reacciones energéticamente desfavorables, no modifican el sentido en los equilibrios químicos pero si aceleran su ejecución. Por ser catalizadores aceleran reacciones químicas para hacerlas instantáneas o casi instantáneas ⁽²⁾.

3.6.2 Clasificación. ⁽²³⁾

El sistema de clasificación es basado en la división de las enzimas en seis grandes clases de acuerdo al tipo de reacción que catalizan. Estas son:

- **Oxidoreductasas:** Catalizan reacciones de óxido-reducción. Ejemplos: alcohol deshidrogenasa, glucosa 1-deshidrogenasa, manitol 2-deshidrogenasa, Benzaldehído deshidrogenasa (NADP+), etc.
- **Transferasas:** Catalizan reacciones de transferencia de grupo. Ejemplos: nicotinamida N-metiltransferasa, histamina N-metiltransferasa, homocisteina S-metiltransferasa, glicina N-metiltransferasa.
- **Hidrolasas:** Catalizan reacciones hidrolíticas. Ejemplos: arilestearasa, galactolipasa, papaína, quimopapaina, etc.
- **Liasas:** Catalizan la extracción de grupos para la formación de dobles enlaces. Ejemplos: piruvatodescarboxilasa, acetato descarboxilasa, linasa descarboxilasa, Metionina descarboxilasa, etc.
- **Isomerasas:** Catalizan isomeraciones. Ejemplos: alaninaracemasa, metionina racemasa, aspartatoracemasa, etc.
- **Ligasas:** Catalizan la formación de enlaces sin hidrólisis de nucleósidosTrifosfato. Ejemplos: tirosina –tRNAligasa, glicina –tRNAligasa, etc.

3.6.3 Características de la acción enzimática más sobresaliente de algunas enzimas con elevada especificidad.

- **Especificidad del sustrato:** El sustrato es la molécula sobre la cual, la enzima ejerce su acción catalítica.
- **Especificidad de acción:** Cada reacción está catalizada por una enzima específica.

3.6.4 Algunos de los efectos que intervienen en la actividad de las enzimas.

- **Efecto del pH:** Tiende a modificar el grado de ionización de todos o algunos grupos ionizables de la molécula de enzima. Modifica la actividad enzimática en tres formas:
 - Los pH extremos cambian el grado de ionización de numerosos grupos de la enzima, alterando su estructura tridimensional.
 - Variaciones pequeñas de pH afectan a un menor número de grupos ionizables, si estos están en el sitio activo, la actividad cambia notablemente.
 - Variación de pH puede alterar el grado de ionización del sustrato.

- **Temperatura:** Una elevación de temperatura aumenta la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas, sin embargo, el empleo de temperaturas altas hace que se incremente la actividad de la enzima pero en detrimento de su estabilidad, que disminuye.

3.7 ENZIMAS PROTEOLITICAS. ⁽⁶⁾

3.7.1 Generalidades.

Un gran número de enzimas proteolíticas producidas por microorganismos son aisladas, purificadas y procesadas para uso medicinal.

3.7.2 Farmacodinamia.

Las enzimas son a la vez proteínas que interactúan con compuestos orgánicos produciéndose la hidrólisis de la proteína o la despolimerización del ADN.

3.7.3 Usos terapéuticos.

Las enzimas proteolíticas son aplicadas tópicamente sobre la superficie de una herida provocando el desbridamiento de ésta. Algunas son administradas sintéticamente con el propósito de disolver coágulos intervasculares o promover la reabsorción de hematomas. Su eficacia en estos casos no está muy comprobada.

Las enzimas proteolíticas son aplicadas generalmente sobre heridas en formas farmacéuticas como: ungüentos, spray, o soluciones irrigatorias.

3.7.4 Reacciones adversas.

La vía tópica es la más utilizada, puede presentarse hipersensibilidad, la cual se manifiesta por inflamación de la zona que rodea la herida, algunas ocasiones existe decoloración en la zona de aplicación de dichas enzimas.

3.7.5 Precauciones y contraindicaciones.

Tienen que protegerse del calor y la agitación para evitar su desnaturalización por ser sustancias proteicas, las soluciones frescas deben prepararse diariamente, la presentación farmacéutica como ungüentos son almacenados en ambientes fríos.

3.7.6 Interacciones con otras drogas.

Las enzimas proteolíticas deben de cuidarse de pH extremos ya que causan su inactivación, la papaína tiene un rango de pH de 3.0 a 12.0, algunas son inactivadas por sustancias oxidantes como el peróxido de hidrogeno, detergentes, yodo, nitrofurazona y hexaclorofeno. Si estas son utilizadas antes

de la aplicación de dichas enzimas se utiliza irrigaciones de solución salina sobre el área de la herida para eliminarlas y poder aplicar el tratamiento con enzimas proteolíticas.

3.8 ENZIMA PAPAÍNA. ⁽¹⁷⁾

3.8.1 Marco histórico.

Se ha sabido que desde hace muchos años los pueblos de la India Occidental prensaban piezas de carne entre las hojas de papaya, con el objeto de suavizarla. En Barbados se añadían masas de frutas verdes a la carne que de otra manera no se podía cocer. Los nativos también usaban el jugo de la papaya con propósitos cosméticos; así, frotaban ya sea el jugo solo o el jugo mezclado con agua o pigmentos en sus pieles, para obtener así un tono de piel más saludable y suave.

El jugo de la papaya también fue usado por los indígenas contra:

- El eczema
- Las verrugas
- Los parásitos intestinales
- Las úlceras y otras llagas
- La difteria
- Múltiples afecciones de la piel

3.8.2 Generalidades.

La papaína es uno de los mayores constituyentes proteicos del látex del fruto verde del papayo (*Carica papaya*). El término de papaína fue introducido por Wurzt y Bouchut para describir el principio proteolítico del látex de la papaya.

Este término es comúnmente aplicado tanto al látex crudo seco, como a la enzima proteolítica cristalina.

La papaína es una proteasa muy bien conocida por su actividad proteolítica. Esta enzima se cree que es producida en carácter de defensa de la fruta contra ser consumida previamente a que sus semillas hallan madurado.

Según los surtidores de papaína, es la enzima proteolítica más potente del mercado y no tiene un sustituto directo. También, no se ha producido ni introducido al mercado una enzima sintética con la misma calidad.

3.8.3 El látex de la papaya.

El látex se encuentra bajo la cáscara de la papaya verde y plenamente desarrollada. Este látex está contenido en unos pequeños vasos largos que se encuentran justamente debajo de la piel. Cuando estos vasitos son cortados, exudan un líquido claro como el agua, el cual se vuelve opaco por su exposición al aire, siendo este líquido la fuente más importante de papaína. Aunque todas las partes de la planta contienen látex, en plantaciones comerciales para obtener papaína, solo los frutos verdes, maduros y sin cortar son usados para la extracción del látex, porque las exudaciones de estos frutos son más vigorosas que de cualquier otra parte de la planta.

El látex de papaya consiste en una mezcla de proteasas o enzimas. Schack demostró la existencia de cuatro componentes principales con actividad proteolítica:

- Papaína
- Quimiopapaína
- Lisozima

- Material no caracterizado en las proteínas solubles del látex

Juntas estas proteínas son más o menos el 64% de las proteínas solubles del látex. La fracción denominada quimiopapaína es el componente proteolítico más abundante en el extracto. La papaína fue cristalizada por primera vez por Ball et. Al. En 1937.

Cabe mencionarse también que la extracción del látex no daña la pulpa del fruto, pudiendo utilizarse este al madurarse, para consumo fresco o considerar la posibilidad de enlatarlo en forma de trozos o rodajas, fabricar mermeladas, vinagre, néctar, etc., ya sea para consumo interno o para exportación.

3.8.4 Aplicaciones industriales. ⁽⁹⁾

La papaína es una enzima proteolítica que tiene muchas aplicaciones y funciones en una gran variedad de industrias.

- **Industria de la cerveza:** La industria cervecera utiliza el 75% de los suministros mundiales totales de papaína, esta se utiliza para clarificar o estabilizar la cerveza contra el frío, o sea para prevenir la formación de niebla o enturbiamiento debido al frío en esta. La niebla debido al frío consiste en partículas muy pequeñas, las cuales resultan de exponer la cerveza a una temperatura menor de 10 °C. La cantidad de niebla formada aumentara a medida que el periodo de almacenamiento aumente o a medida que la temperatura disminuya.

Este problema existe debido a que la cerveza producida es almacenada por largos periodos de tiempo a temperaturas muy bajas.

La composición de la niebla debida al frio varía de cerveza en cerveza. Esta generalmente consiste en taninos, carbohidratos y proteínas. La porción de taninos de esta niebla generalmente consiste de polifenoles.

La porción de carbohidratos consiste en compuestos de bajo peso molecular como glucosa, xilosa y arabinosa. El uso de papaína tiende a hidrolizar la fracción proteínica de la niebla debida al frio, la cual es la causante esencial de esta turbidez; en pocas palabras, las proteínas se pueden disolver gracias a la papaína y, en consecuencia la niebla u opacidad desaparece.

- **Posibilidades potenciales de utilización de la papaína:** Otras posibles aplicaciones que tiene la papaína son: La posibilidad de usarla en la fabricación de quesos, en la coagulación de la leche, en la fabricación de margarina exenta de efecto cuajante, en la panificación, en laboratorios bacteriológicos, en investigación de proteínas, en la industria del papel, etc.

Una aplicación nueva, que es potencialmente muy grande, pero que es todavía de poca importancia hoy en día, es en la proteólisis de productos como la soya y el pescado.

3.8.5 Aislamiento. ⁽¹⁷⁾

El látex de la papaya contiene una mezcla de enzimas, la composición de este y algunas de las características de sus fracciones enzimáticas se muestran en el siguiente cuadro.

Tabla N° 1. Características de las enzimas del látex de papaya.

ENZIMA	PESO MOLECULAR	PUNTO ISOELÉCTRICO	CONCENTRACIÓN DEL LÁTEX
Papaína	21,000	8.75	10%
Quimiopapaína	36,000	10.10	45%
Lizosima	25,000	10.50	20%

La papaína puede separarse del resto de enzimas y prepararse rápida y económicamente, en una forma cristalina, en un estado de pureza bueno y en cantidades razonables, a partir del látex seco comercial. Se han desarrollado muchos métodos para aislar la papaína del resto de enzimas, entre ellos cabe mencionar el desarrollado por Kimmel y Smith, que es uno de los métodos más usados de extracción de papaína.

Este procedimiento comprende una extracción del látex, eliminación del material insoluble en el extracto a un pH=9, precipitaciones con sulfato de amonio, seguidas de tres recristalizaciones. La papaína pura obtenida por este método contiene tres componentes:

- Papaína activa
- Papaína no activable
- Papaína activable

Por este método se obtienen aproximadamente de 6 a 7 mg de papaína pura por gramo de látex seco. En general, lo que se busca en la purificación del látex seco es:

- Reducir el contenido de componentes no proteolíticos, para obtener una fracción con mayor actividad proteolítica.
- Separar la papaína u otro componente del resto de enzimas o compuestos con actividad proteolítica (o al menos incrementar la proporción de esta).

- Obtener un producto más estable para incrementar su vida de almacenamiento.
- Obtener un producto estéril para una aplicación específica.

La papaína aislada representa solo una parte menor del total de actividad proteolítica, esto se debe a que hay otra enzima proteolítica presente en el látex en una proporción considerablemente mayor, que también ha sido aislada en forma cristalina por medio de un procedimiento diferente, siendo esta la quimiopapaína. La suma de las actividades de estas dos enzimas cristalinas representa casi el total de la actividad proteolítica del látex fresco.

3.8.6 Propiedades físicas.

De acuerdo a Balls Y Lineweaver, la papaína cristalina se presenta en forma de agujas bajo el microscopio. Algunas veces, presenta otra forma de cristales, laminas largas con caras hexagonales alargadas, menos solubles en agua.

La papaína cristalina es soluble en agua y en alcohol etílico o metílico al 70% y notablemente estable en solución de urea 9.0 M, pero puede ser precipitada fácilmente (Salting out) en solución, especialmente a bajas temperaturas.

Tabla N° 2. Propiedades físicas de la papaina.

PROPIEDAD	VALOR
Punto isoeléctrico	pH= 8.75
Constante de sedimentación	2.42 ± 0.04 seg
Constante de difusión	10.27 ± 0.13×10 ⁷ cm ² seg ⁻¹
Peso molecular	23,350 Daltons
Rotación óptica (pH= 5.7, 25°C)	-66.7

3.8.7 Composición química y estructura.

La papaína es funcionalmente clasificada como una enzima hidrolasa y proteasa tiolica. Fue la primera enzima reconocida como miembro de una clase de enzimas proteolíticas que necesitan un grupo sulfhidrilo libre para desarrollar su actividad. La base de datos SCOP (siglas en inglés para Clasificación Estructural de Proteínas) coloca a esta enzima en la clase de las Proteasas Cisteínicas (Superfamilia: Proteasas Cisteínicas).

La papaína existe como un monómero, consistente de 212 residuos. Es una proteína simple conteniendo solamente aminoácidos y desprovista de carbohidratos. Todos los aminoácidos usuales están presentes con excepción de la metionina.

La composición elemental de la papaína cristalina ha sido reportada que contiene un 16.1% de nitrógeno y un 1.2% de azufre. La composición de aminoácidos reportada por Smith y Kimmel se muestra en siguiente cuadro:

Tabla N° 3. Composición en aminoácidos de la papaína.

AMINOÁCIDO	% DE PROTEÍNA
Tirosina	14.71
Acido glutámico	12.43
Acido aspártico	11.32
Glicina	8.60
Valina	8.43
Arginina	7.75
Leucina	6.10
Alanina	6.08
Isoleucina	6.05
Serina	5.91
Lisina	5.67
Prolina	5.11

Tabla N° 3 (Continuación)

Triptofano	4.68
Treonina	3.89
Fenilalanina	3.16
Histidina	0.85



Figura N° 7. Secuencia de aminoácidos de la enzima papaína.

3.8.8 Estabilidad.

La enzima cristalina muestra un alto grado de estabilidad. Como cristales en suspensión en solución de cloruro de sodio, puede mantenerse a 4 °C por varios meses sin pérdida detectable de su actividad. Sin embargo la propiedad más notable de la papaína es su estabilidad cuando se expone a altas temperaturas, solventes orgánicos y reactivos los cuales pueden causar la desnaturalización de otras enzimas. Algunas propiedades y factores que influyen en la acción de la papaína son:

- **Temperatura:** Es de recordar que los nativos del trópico ablandaban su carne hirviéndola con pedazos de papaya verde o con su jugo; este fenómeno fue reportado por numerosos investigadores de este campo desde hace mucho tiempo. Las enzimas proteolíticas son tradicionalmente poco estables al calor, pero la papaína es relativamente la enzima más estable en un rango de temperatura amplio, propiedad que no es compartida por otras proteasas vegetales.

Wurtz encontró que una muestra de papaína todavía retiene actividad después de haber sido calentada a 105° C. Esto se basa en el descubrimiento de que la papaína resiste calor seco a 100° C por 3 horas.

Sin embargo cuando se usó papaína en solución, su actividad fue destruida por calentamiento a 82.5°C, esto se debe a que la papaína es más estable en estado sólido que en solución.

- **pH del medio:** Una de las peculiaridades de la papaína es su actividad proteolítica en un amplio rango de condiciones de pH. Declaraciones recientes muestran que la papaína es activa en un medio ácido, neutro y básico, cubriendo esta actividad un rango de pH de 3 a 12.

En efecto este es probablemente el rango efectivo más amplio de pH que el de cualquier otra enzima proteolítica. También se ha reportado que el óptimo de estabilidad de la papaína en solución es del rango de pH de 5 a 6. La acción óptima de papaína sobre caseína ha sido encontrada a un pH de 6.5 y 7.

- **Efecto del almacenamiento:** La papaína pierde la actividad durante su almacenamiento, especialmente cuando esta se encuentra en solución.

Se han reportado pérdidas de actividad de preparaciones comerciales de papaína que se han almacenado durante varios meses o durante un año, y también de muestras de papaína de diversos grados de pureza que han perdido en promedio, cerca de un 30% de su actividad en 3-6 meses, cuando se han mantenido a 25°C.

El método de preparación de la papaína es muy importante en relación a su estabilidad durante el almacenamiento. Estudios especiales sobre la estabilidad de la papaína han confirmado que mucha de la actividad del látex se pierde durante el secado y su subsecuente almacenamiento.

3.8.9 Activación de la papaína.

La papaína es activada por agentes reductores y desactivada por agentes oxidantes.

Los agentes más comunes usados son cisteína, cianuro y sulfuros. Es importante enfatizar que aunque la papaína requiere activación, no es requerida la presencia continua del activador, la efectividad del sistema activador depende de cual sistema buffer sea utilizado. Esta variabilidad del sistema buffer es eliminada si el EDTA (ácido etilendiaminotetracético) es usado en unión del agente reductor.

Varios agentes como el yodo, bromo, peróxido de hidrógeno diluido y oxígeno atmosférico inactivan la papaína bajo ciertas condiciones. Estos efectos han sido explicados por la naturaleza del grupo "tiol" de la enzima, el cual es activo en estado reductor e inactivo en estado oxidado.

3.8.10 Sitio activo.

La interacción entre enzima y sustrato ocurre en la superficie de la molécula de papaína en un surco el cual está situado entre las dos partes de la molécula. La cadena lateral de cisteína 25 se encuentra en la ranura, si el grupo SH de la cisteína no se encuentra libre, ya sea por bloqueo por metales pesados, por agentes alquilantes o por formación disulfídica, la actividad de la enzima desaparece completamente.

Cercano al grupo sulfhídrico se encuentra el anillo imidazólico de la histidina 159, el cual se encuentra unido a su vez a través de puentes de hidrógeno, con la cadena lateral de asparagina 175; dándole forma a la triada catalítica que forma el sitio activo de la papaína.

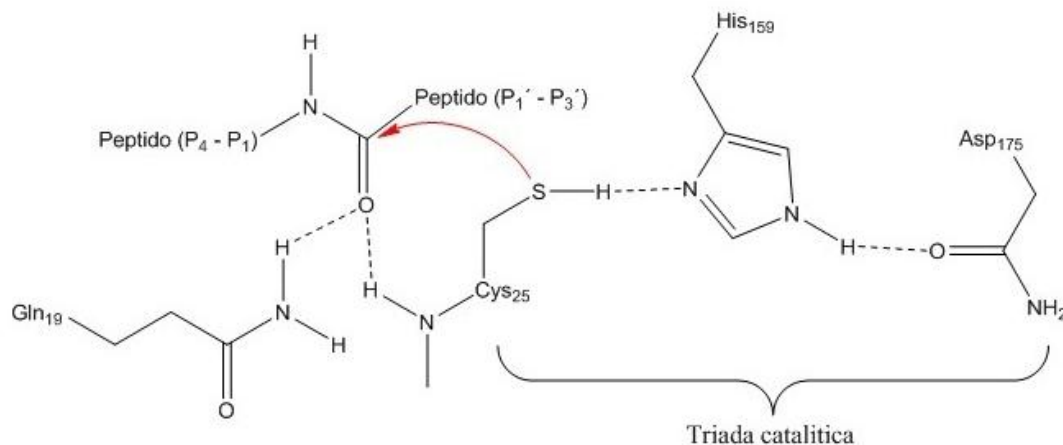


Figura N°8. Triada catalítica de la enzima papaína.

3.8.11 Especificidad. ⁽¹⁰⁾

Se ha conocido desde hace muchos años que la papaína puede producir una degradación de la proteína en muchos sustratos, más que cualquier otra

proteasa vegetal conocida. La papaína tiene una amplia especificidad, así puede hidrolizar sustratos sintéticos que son los generalmente usados para tripsina, quimiotripsina o pepsina. La papaína es también muy activa en la hidrólisis de amidas y ésteres. La papaína hidroliza las amidas de la arginina, lisina, glutamina, histidina, glicina y tirosina, todas ellas α -amino sustituidas.

La amplia variedad de enlaces peptídicos hidrolizados por la papaína puede ser superficialmente interpretado como indicativo de un bajo grado de especificidad de la enzima. Sin embargo, numerosos estudios han demostrado que factores gobernando la especificidad de la papaína no pueden ser discernidos a partir del examen de su acción sobre pequeños sustratos sintéticos o sobre péptidos pequeños elegidos al azar.

Debido a su amplia especificidad, la papaína no ha sido comúnmente usada para la hidrólisis de proteínas y polipéptidos muy largos, sin embargo, ha sido excesivamente valiosa para la hidrólisis de péptidos de moderado tamaño cuando estos no contienen enlaces del tipo susceptible a las ampliamente utilizadas tripsina y quimiotripsina.

La aplicación de sustratos sintéticos simples en el estudio de la especificidad de enzimas proteolíticas ha resultado con grandes progresos para el entendimiento de la acción de la papaína. Usando dichos sustratos se ha encontrado que los preparados comerciales de papaína no atacan los dipéptidos, o si lo hacen, lo hacen muy despacio. Kimmel y Smith, han reportado que el ácido carbobenzoxi-L-glutámico es un inhibidor de la papaína en la región de pH de 3.9 - 4.5; también se ha demostrado que el ácido carbobenzoxi-L-aspartico produce inhibición similar.

3.8.12 Tipos de papaína. ⁽¹⁷⁾

Los principales tipos de papaína que actualmente se venden en el mercado internacional son:

- **Papaína Cruda:** Esta se obtiene por el secado del látex al sol o en hornos rústicos. Es un producto de baja calidad, baja estabilidad biológica y por lo tanto de vida corta y de una actividad proteolítica relativamente baja (aproximadamente 350 unidades tirosina/mg), su rendimiento a partir del látex fresco es de un 20% en peso aproximadamente.

- **Papaína Semirefinada:** Es obtenida por secado del látex bajo condiciones controladas. Sin embargo su vida es limitada a 6-8 meses, su rendimiento a partir del látex es de un 25% en peso aproximadamente y su actividad proteolítica es más bajo que de la papaína completamente refinada (450-500 unidades tirosina/mg). Su color es blanco.

- **Papaína Refinada:** Este producto es biológicamente estable y completamente libre de materia extraña, y tiene una actividad proteolítica más alta que las anteriores (800-1000 unidades tirosina/mg y más). Generalmente es obtenida a través de un proceso de secado por aspersión al vacío (método de Bourdart); a grandes rasgos la secuencia de operaciones que sigue este látex son: Homogenización, clarificación, filtración sobre placas clarificantes, concentración, filtración esterilizante y atomización. La relación de látex fresco a papaína que se vende refinada es de 6:1 o 7:1. Es la papaína más purificada que se vende actualmente en el mercado internacional. También existen otros métodos para su obtención, como el de fraccionamiento alcohólico.

3.8.13 Extracción y recolección del látex.

La extracción del látex se lleva a cabo por medio del estriado de los frutos verdes. El estriado consiste en hacer incisiones longitudinales en la cáscara del fruto; respecto a la profundidad de las incisiones, algunos autores recomiendan que estas no sean mayores de 2 mm. Mientras que otros dan un rango de variabilidad de 2 a 2.5 mm, y algunos opinan que la profundidad de estas pueden ser de hasta 3mm.

Debe de cuidarse mucho esto, ya que incisiones profundas podrían causar infecciones, echando a perder el fruto.

Se recomienda utilizar materiales no oxidables para la extracción del látex. Así, los incisores deben ser de acero inoxidable, aluminio, madera, hueso, vidrio, o bambú, pero nunca de metal corriente, esto es debido a que la papaína pierde su actividad fácilmente al estar en contacto con metales como el hierro y el cobre. Las hojas de afeitar de acero inoxidable de doble filo han sido utilizadas con éxito para ello.

Generalmente el incisor consiste de una vara de madera, a la cual se le prende un trozo de hoja de afeitar o navaja, de un tamaño tal, que vaya de acuerdo con la profundidad deseada de las incisiones.

Una vez realizadas las incisiones, el látex fluye, y cae en los recipientes colectores. Estos recipientes deben ser siempre de un material que no desactive la papaína, así pueden usarse de acero inoxidable, porcelana, vidrio, metal esmaltado, plástico, lona, aluminio.

El látex que coagula sobre la incisión, luego que ha cesado el flujo, se raspa, con utensilios no corrosivos y se mezcla con el anterior, ya que no existe

diferencia en la actividad proteolítica entre la papaína obtenida del látex fluido y del que coagula en la incisión.

Luego de ser colectado el látex, este es transportado en recipientes de material adecuado y se somete ya sea a un simple proceso de secado o directamente a un proceso de purificación, dependiendo de su uso final.

3.9 DEFINICION DE MEDICION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA. ⁽¹⁰⁾

La efectividad o potencia de una enzima es más últimamente expresada en términos de actividad. Cuando es posible esta es expresada en unidades de actividad las cuales se definen en términos del peso de sustrato transformado en producto, en un tiempo determinado. En el caso de la papaína, que es una enzima proteolítica, una unidad de actividad es la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de un mol de sustrato en un minuto.

La proporción en que la enzima cataliza las reacciones está afectada por la concentración del sustrato, la temperatura y el pH de la solución en que es medida, por lo tanto ambas condiciones deben ser establecidas para que la medición tenga sentido y pueda usarse para propósitos comparativos.

Actualmente hay tres tipos de comunes de ensayos utilizados para medir la actividad de la papaína:

- El método que se basa en la hidrólisis de moléculas de bajo peso molecular de sustratos sintéticos; estos métodos son los más exactos, más caros y menos pertinentes para aplicaciones prácticas.

- El método que se basa en el grado de hidrólisis de sustratos proteínicos; existe una gran variedad de estos métodos debido a tanta combinación de

proteínas y metodología a escoger, son los métodos más útiles y confiables siempre que se especifique la naturaleza y fuente de proteína usada así como las condiciones en que se lleva a cabo el ensayo.

- Los métodos que se basan en la habilidad de la enzima para coagular la leche, estos métodos son los más baratos en términos de materiales, pero no en el tiempo que se toman. Los resultados se expresan en unidades de coagulación de leche (m.c.u. = milk clotting unites).

3.9.1 Método modificado de Kunitz.

En esta tesis se trabajara para medir la actividad de la papaína con el método modificado de Kunitz para la determinación de la actividad proteolítica de la enzima; este método pertenece al segundo grupo de métodos de medición de actividad proteolítica antes mencionado.

3.9.2 Principio del método.

Una solución de la enzima es incubada, bajo condiciones estándar con caseína desnaturalizada. La reacción es detenida por la adición de ácido tricloroacético (TCA).

La proteína no hidrolizada es precipitada por el TCA añadido. El precipitado es removido por filtración y la absorbancia de la capa sobrenadante es medida espectrofotométricamente a 280 nm. El incremento de la absorbancia a 280 nm, después de la incubación es una medida de la actividad enzimática ⁽⁵⁾.

3.10 LIOFILIZACION. ⁽¹⁷⁾

3.10.1 Características de la liofilización.

La liofilización consiste en una desecación del sólido que contiene disolvente (generalmente agua). En primer lugar, el producto es congelado y, más tarde, el disolvente será eliminado por sublimación a través de un sistema de vacío. El sólido, por ello, no pierde sus características originales. El producto resultante es un polvo liofilizado, que debe ser reconstituido en el momento de su utilización.

3.10.2 Etapas de la liofilización.

Para efectuar la liofilización se siguen varias etapas:

- **Congelación:** Para conseguirla se somete el producto a temperaturas muy bajas (-20°C), con la mayor rapidez posible para no modificar su estructura.

- **Desecación primaria:** Se realiza mediante un sistema de vacío que permite que el agua pase a gas por sublimación a baja temperatura.

- **Desecación secundaria:** Consiste en eliminar la humedad residual del agua, fuertemente ligada, mediante evaporación.

- **Rehidratación del producto liofilizado.**

3.10.3 El liofilizador.

El liofilizador es un aparato en el que podemos distinguir una serie de partes:

- **Cámara de liofilización o cámara de desecación:** En la que se encuentran unas bandejas huecas por las que transcurre el fluido calefactor o el refrigerante, y en las que se coloca el producto previamente congelado o no,

dependiendo del liofilizador. El fluido refrigerante o calefactor se hará pasar según la fase del proceso en la que nos encontremos.

- **Cámara de condensación:** Que dispone de una tubería fría (condensador) cuya función es enfriar el vapor de agua obtenido en la cámara de liofilización, quedando en forma de hielo adherido a sus paredes y evitando que ingrese en la cámara de vacío.

- **Bombas de vacío:** Se encuentra conectadas a las dos cámaras, de tal manera que, cuando comienza el proceso, se cierra la conexión con la cámara de liofilización, pero no con la de condensación, para que así el vapor producido sea arrastrado al condensador. Por efecto del vacío, se producirá sublimación de hielo que pasa a vapor, con lo que el producto se va desecando progresivamente, descendiendo su temperatura. Por ello, es necesario aportar posteriormente calor a las placas. Cuando se haya producido la sublimación, su temperatura aumentará hasta igualar la de las placas calefactoras y el vapor será arrastrado al condensador

3.11 ENSAYO DE LÍMITES MICROBIANOS. ⁽³⁾

Los límites microbianos son las pruebas por medio de las cuales se estima un número de microorganismos aerobios, mohos y levaduras presentes en especialidades farmacéuticas y determinar si dichas especialidades están exentas de ciertos microorganismos patógenos, estas especialidades incluyen:

- Materia prima
- Producto en proceso
- Producto terminado

Esta es una prueba que permite darle protección al consumidor, ya que asegura la calidad microbiológica del producto. Por lo que la industria farmacéutica reconoce la necesidad de un control microbiológico de estos productos desde el punto de vista: Salud pública, estabilidad del producto y financiero.

3.11.1 Características de los microorganismos.

3.11.1.1 *Escherichia coli*.

Es un bacilo corto que puede formar cadenas y que reacciona negativamente a la tinción de Gram. Es anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos, no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa y su prueba de IMVIC es ++--.

E. coli y la mayor parte de las bacterias intestinales forman colonias circulares convexas y lisas con bordes definidos. La *E. coli O157:H7* es una de cientos de cepas de la *E. coli*. Aunque la mayoría de las cepas son inocuas y viven en los intestinos de los seres humanos y animales saludables, esta cepa produce una potente toxina y puede ocasionar una enfermedad grave. Se diferencia de las otras *E. coli* en que no fermenta el sorbitol, no crece a 44 °C y no produce β -glucoronidasa.

3.11.1.2 *Staphylococcus aureus*.

Los *Staphylococcus* son células esféricas, gram positivas, cuyo diámetro varía de 0.5 a 1.5 μm ; en frotis teñidos aparecen en grupos irregulares en forma de racimos. Crecen mejor en condiciones aerobias, pero son anaerobios facultativos; la temperatura de crecimiento es de 30° a 37° C; no son móviles y no forman esporas.

El ***S. aureus*** es una bacteria gram-positiva redondeada, que aparece como elemento aislado, formando parejas tétradas o agrupaciones irregulares en forma de racimos. Pertenece a la familia ***Micrococaceae***. Dentro del género se reconocen al menos 20 especies diferentes, siendo el ***S. aureus*** la que con más frecuencia produce infecciones en el hombre.

Los ***Staphylococcus*** se tiñen fácilmente con colorantes básicos y son fuertemente gram-positivos. La mayoría de las cepas no son capsuladas, sin embargo, el ***S. aureus*** forma cápsulas; morfológicamente puede ser evidente, o bien detectarse mediante métodos inmunológicos.

En medios sólidos el crecimiento es abundante; las colonias son desde traslúcidas a opacas, con algunas variaciones en el perfil y en el margen de la colonia; estas variaciones son útiles para la diferenciación.

Algunos ***Staphylococcus*** producen pigmentos carotenoides, formando colonias de color amarillo-dorado, amarillo-limón o cremoso. La pigmentación se da más a menudo en ***S. aureus***, siendo más o menos constante en los aislados primarios.

S. aureus forman colonias grises a amarillo dorado intenso, producen catalasa, fermentan con lentitud muchos carbohidratos y producen ácido láctico pero no gas.

3.11.1.3 ***Pseudomonas aeruginosa***.

Pseudomonas aeruginosa (o ***Pseudomonas pyocyanea***) es una bacteria gram-negativa, aeróbica, con motilidad unipolar. Es un patógeno oportunista para los humanos, lo es también para las plantas.

La ***Pseudomonas aeruginosa*** es frecuentemente y preliminarmente identificada por su apariencia perlada y olor a grapa ***in vitro***. La identificación definitiva frecuentemente incluye identificar la producción de ambas piocianina y fluoresceína como su habilidad de crecer a 42° C.

La biosíntesis de piocianina es regulada por mecanismos homeostáticos, asociada a la colonización de ***P. aeruginosa*** en los pulmones de los pacientes con fibrosis quística.

Este patógeno oportunista de individuos inmunocomprometidos, infecta el tracto pulmonar, el urinario, tejidos, heridas y también causa otras infecciones de sangre.

3.11.1.4 *Salmonella spp.*

Las ***Salmonellas*** son bacilos gram-negativos, la mayor parte de ellas son móviles y tiene flagelos peritricos. Estos microorganismos crecen con facilidad en medios sencillos, pero casi nunca fermentan la lactosa o la sacarosa, forman ácido y a veces gas a partir de la glucosa y manosa, suelen producir H₂S, sobreviven a la congelación en el agua durante periodos prolongados, son resistentes a ciertos productos químicos (Ej. verde brillante, tetracionato de sodio y desoxicolato de sodio) que inhiben a otras bacterias intestinales; por lo tanto estos compuestos son de utilidad para su inoculación en los medios de cultivo con objeto de aislar a ***Salmonella spp*** del excremento.

3.11.1.5 Hongos.

Los mohos son hongos filamentosos multicelulares cuyo crecimiento en la superficie de los alimentos se suele reconocer fácilmente por su aspecto

aterciopelado o algodonoso; la parte principal de su crecimiento suele tener un aspecto blanco, aunque puede tener colores distintos, color oscuro o color humo.

El talo o cuerpo vegetativo de los mohos está formado por una masa filamentosamente ramificada y entrelazados llamados hifas denominándose micelio al conjunto de estas hifas.

En general en comparación con la mayoría de las levaduras y de las bacterias, la mayoría de mohos necesitan menor cantidad de humedad disponible.

La mayoría de los mohos podrían considerarse mesófilos, es decir que son capaces de crecer bien a temperaturas normales. Para la mayoría de los mohos la temperatura óptima de crecimiento se encuentra alrededor de los 25° a 30° C, aunque algunos crecen bien a temperaturas comprendidas entre los 35° y los 37° C o incluso temperaturas superiores. Algunos mohos son psicótrofos, es decir crecen bastante bien a temperaturas inferiores a la de congelación. Unos pocos son termófilos, es decir crecen a temperaturas elevadas.

Los mohos son aerobios, necesitan oxígeno para crecer, esto es cierto por lo menos en los mohos que crecen en la superficie. Casi todos los mohos capaces de crecer dentro de un amplio intervalo de concentraciones de iones H^+ (pH comprendido entre 2 y 8.5), aunque la mayoría crece mejor a pH ácido.

3.11.1.6 Levaduras.

El término levadura se emplea de forma habitual, si bien su identificación resulta difícil. En el sentido que aquí se emplea, se refiere a aquellos hongos que

generalmente no son filamentosos, sino unicelulares y de forma ovoide u esferoide y que se reproducen por gemación o fisión.

La forma de las levaduras pueden ser desde esféricas hasta ovoides alimonada, periforme cilíndrica, triangular e incluso alargada, constituyendo un verdadero micelo o un falso micelo. Se diferencian también en cuanto a su tamaño.

En la mayoría de los casos, el crecimiento de las masas de las levaduras no resulta apropiado para identificar estos microorganismos, no obstante, el aspecto del crecimiento de los organismos tiene importancia cuando estos producen un moteado pigmentado en la superficie.

Las levaduras son oxidativas, fermentativas o bien su actividad metabólica es a la vez de ambos tipos. En la superficie de un líquido, las levaduras oxidativas pueden crecer en forma de película, de velo o de espuma y por ello se denominan levaduras formadoras de películas.

La mayoría de las levaduras necesitan más humedad que los mohos. El intervalo de temperatura de crecimiento de la mayoría de las levaduras es, en general parecido a la de los mohos, con una temperatura óptima en torno a los 25-30° C y una temperatura máxima en torno a los 35-47° C.

Algunas especies son capaces de crecer a temperaturas de 0° C o inferiores. Una reacción ácida del medio próxima a un pH de 4 a 4.5 estimula el crecimiento de la mayoría de las levaduras, mientras que en medios básicos no crecen bien a no ser que se hayan adaptado a los mismos.

Las levaduras crecen mejor en aerobiosis sin embargo las especies de tipo fermentativo son capaces de crecer, aunque lentamente en anaerobiosis.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 TIPO DE ESTUDIO.

La investigación realizada fue un estudio experimental, retrospectivo, prospectivo y longitudinal.

- **Experimental**, porque a través de la aplicación tópica de papaína en un grupo de 13 pacientes seleccionados se evaluó la actividad de la enzima en el mejoramiento estético de cicatrices tipo queloides y de verrugas.
- **Retrospectivo**, porque existen estudios anteriores a esta investigación que sirvieron como base para demostrar las diferentes aplicaciones de la enzima papaína en tratamientos de la piel.
- **Prospectivo**, ya que se obtuvieron nuevos datos con respecto a la aplicación de la enzima en el mejoramiento de cicatrices tipo queloides y verrugas.
- **Longitudinal**, porque existió un límite de tiempo para la aplicación tópica de la enzima y la obtención de resultados.

4.2 INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA.

- Biblioteca Central de la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca Dr. Benjamín Orozco, Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador.
- Biblioteca Dr. Emilio Álvarez, Facultad de Medicina. Universidad de El Salvador.
- Biblioteca de la Universidad Centroamericana José Simeón Cañas.
- Internet.

4.3 UNIVERSO Y MUESTRA.

El universo de la investigación consistió en todos los pacientes con cicatrices tipo queloide y verrugas.

La muestra del estudio consistió en 9 pacientes con cicatrices de tipo queloides y 4 pacientes con verrugas, a los cuales se les asignaron códigos para su identificación y a quienes se les aplicó la enzima papaína liofilizada, además, se tomaron 2 pacientes control, 1 paciente con cicatriz tipo queloide y 1 paciente con verruga a quienes se les asignaron códigos y se les aplicó el medicamento Contractubex® (ver Anexo N° 23) y el medicamento Callosil® (ver Anexo N° 24) respectivamente, ambos medicamentos prototipo para cada una de estas afecciones. La finalidad de las aplicaciones de estos medicamentos era la de establecer una comparación entre la actividades observadas por parte de la enzima papaína liofilizada y el medicamento prototipo.

4.4 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LOS PACIENTES

Los pacientes con cicatrices tipo queloide a los que se les aplicó la enzima papaína liofilizada, fueron seleccionados de forma aleatoria, pero para la realización de dichas aplicaciones debían cumplir con dos requisitos, primero presentar una cicatriz queloide completamente cerrada, y segundo firmar la carta de consentimiento informado que se les proporciono. De igual forma los pacientes con verrugas a los que se les aplicó la enzima papaína liofilizada fueron seleccionados de manera aleatoria y debían cumplir los mismos requisitos: Presentar una verruga intacta y firmar la carta de consentimiento informado proporcionada. Pero además de esto también debían someterse a una evaluación por parte de un médico para confirmar la identidad de la verruga. Tanto para los pacientes con cicatriz tipo queloide como para los

pacientes con verruga el tratamiento sería suspendido de presentarse reacciones adversas severas.

4.5 MÉTODOS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

El método de recolección de datos consistió en medir las dimensiones de la cicatriz o verruga y fotografiar antes y después del tratamiento, con esto se determinó los cambios que ocurrieron en cuanto al aspecto físico de las cicatrices tipo queloides y las verrugas. Además se preguntó a cada paciente sobre cualquier efecto o reacción experimentada durante el tratamiento. Dicho tratamiento se efectuó una vez por semana por un periodo de cuatro semanas.

Los parámetros medidos en cicatrices tipo queloides y verrugas fueron el largo, ancho y altura los cuales se reportan en centímetros.

4.6 RECOLECCION DE LAS MUESTRAS, EXTRACCION Y LIOFILIZACION DEL LATEX.

4.6.1 Recolección de las muestras. Ver Anexo N° 1.

Las papayas fueron recolectadas en el mercado Central de San Salvador. Se seleccionaron 30 papayas verdes plenamente desarrolladas para la extracción del látex.

4.6.2 Extracción del látex de *Carica papaya* (papayo) cultivado en el país. ⁽¹⁷⁾ Ver Anexo N° 3.

a) Sanitizar el área de trabajo: Limpiar el área con toalla. Agregar texapón y lavar con mascón, posteriormente lavar con agua destilada y por último

agregar cloruro de benzalconio, dejar actuar por 10 minutos y secar con toalla.

- b) Sanitizar las papayas lavándolas con jabón, luego con agua destilada, y dejar secar.
- c) Colocar mecheros alrededor del área de trabajo para evitar contaminación.
- d) Hacer incisiones en la papaya con un bisturí de acero inoxidable, tener cuidado de no cortar el fruto.
- e) Recolectar el látex en un beaker esterilizado, luego trasladar a tubos previamente esterilizados, inmediatamente después colocar en refrigeración a -20°C por un período de 3 días.

4.6.3 Liofilización del látex. ⁽¹⁷⁾ Ver Anexo N° 4.

- a) Encender el aparato liofilizador Telstar Cryodos 6, hasta que la presión llegue a cero.
- b) Transportar las muestras congeladas en un recipiente hermético hasta el liofilizador.
- c) Colocar los tubos con el látex congelado dentro de balones de 250 mL y conectar estos a las válvulas del cilindro del condensador del aparato liofilizador, tener cuidado que la presión no baje.
- d) Abrir las válvulas con las que se efectúa el vacío en el interior del recipiente para comenzar la sublimación de la muestra.

- e) Dejar en funcionamiento el equipo por un periodo de 6 a 7 horas hasta su total desecación.
- f) Almacenar la enzima liofilizada en refrigeración en frascos viales previamente esterilizados (estas muestras tienen una duración de aproximadamente 3 años). ⁽¹⁷⁾

4.7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE LA ENZIMA PAPAÍNA LIOFILIZADA. ⁽¹⁰⁾

Es importante tener en cuenta los cambios que experimenta la enzima liofilizada con respecto a sus propiedades, es por eso que en base al desarrollo del ensayo de actividad por el método modificado de Kunitz, se verifico el efecto del cambio de pH y el efecto del cambio de temperatura de la enzima, por un contacto directo que esta tiene con el substrato presente en la reacción.

4.7.1 Ensayo general de la actividad por el método modificado de Kunitz. ⁽¹⁰⁾

Ver Anexo N° 5.

- a) Etiquetar tres tubos de ensayo de la siguiente manera: E^{15} , E^0 y $E^{0'}$, donde el contenido final de los tubos será:
 - E^{15} = Caseína, solución de papaína y solución de ácido tricloroacético.
 - E^0 = Caseína y solución de ácido tricloroacético.
 - $E^{0'}$ = Solución de papaína.
- b) Pipetear 1.0 mL de sustrato de caseína ajustado a pH 9 en los tubos E^{15} y E^0 (con Ácido cítrico 0.05M o Hidróxido de sodio 0.2N).

- c) Colocar los dos tubos anteriores en baño de agua a 40°C y dejar reposar por 10 minutos.
- d) Añadir 1.0 mL de la solución de papaína en el tubo E¹⁵ y en el tubo E⁰, agitar.
- e) Colocar en el baño de agua los tubos E¹⁵ y E⁰ e incubar por 15 minutos.
- f) Adicionar en los tubos E¹⁵ y E⁰ 3.0 mL de solución de ácido tricloroacético, agitar después de cada adición.
- g) Adicionar el contenido del tubo E⁰ en el tubo E⁰.
- h) Colocar los tubos en baño María a 40°C durante una hora para permitir la coagulación completa de la proteína precipitada.
- i) Filtrar con papel filtro Whatman# 42.
- j) Leer las absorbancias de los filtrados a 280 nm. Utilizar como blanco solución de ácido tricloroacético.

4.7.2 Ensayo de actividad enzimática en relación con el pH. ⁽¹⁰⁾

- a) Preparar soluciones de buffer fosfato a pH 4.5, 5.5 y 6.0, no preparar el buffer para el ensayo a pH 9.0.
- b) Preparar el substrato de caseína y las soluciones de papaína ajustadas a cada uno de los pH.

- c) Desarrollar el ensayo de actividad como indica el método modificado de Kunitz. Mantener siempre la temperatura constante a 40°C.

4.7.3 Ensayo de la actividad enzimática en relación a la temperatura. ⁽¹⁰⁾

- a) Preparar la solución de buffer fosfato a pH 5.5.
- b) Preparar el substrato caseína y la solución de papaína ajustada para dicho pH.

- c) Desarrollar el ensayo de actividad como indica el método modificado de Kunitz. Variar la temperatura a 32, 37 y 42 °C.

4.8 ENSAYO DE LÍMITES MICROBIANOS. ⁽²²⁾

4.8.1 Recuento total de microorganismos aerobios (método en placa). Ver Anexo N° 8.

- a) Pesar asépticamente 1.0 g de muestra. Agregar luego 9.0 mL de solución amortiguadora de Fosfato pH 7.2 para obtener 10 mL. Hacer diluciones decimales de 10^{-2} , y 10^{-3} , para obtener de 1 mL entre 30 y 300 colonias.

- b) Pipetear 1.0 mL de cada dilución y transferir a dos placas de Petri estériles; agregar inmediatamente, a cada placa, de 15 a 20 mL de Medio Agar Digerido de Caseína y Soya, previamente fundido y enfriado a una temperatura aproximada de 45°C.

- c) Cubrir las placas de Petri y la homogenizar la muestra rotando suavemente las placas sobre una superficie plana (técnica del ocho), dejar solidificar el contenido a temperatura ambiente.

- d) Invertir las placas de Petri e incubar durante 48 a 72 h a una temperatura de 30 a 35°C.
- e) Examinar las placas una vez finalizada la incubación para verificar crecimiento de microorganismos.
- f) Contar el número de colonias y expresar el promedio de las dos placas de cada dilución en términos del número de microorganismos por g (UFC/g) de muestra.

4.8.2 Determinación de ausencia de *Staphylococcus aureus*. Ver Anexo N°10.

- a) Pesar asépticamente 1.0 g de muestra y suspender en 9.0 mL de Medio Líquido Digerido de Caseína y Soya, para obtener 10 mL, mezclar e incubar a una temperatura de 30 a 35°C durante 24 h.
- b) Utilizar un asa de inoculación y realizar estrías con una porción del Medio Líquido Digerido de Caseína y Soya en la superficie del Medio Agar Baird-Parker contenido en placas de Petri.
- c) Invertir e incubar las placas con el Medio Agar Baird-Parker a una temperatura de 30 a 35°C por un tiempo de 24 h.
- d) Examinar las placas y comprobar si se recuperaron colonias microbianas que se ajusten a la descripción del cuadro 1, de ser así proseguir con la prueba de coagulasa, si ninguna de las placas llegase a contener colonias con las características enumeradas en el cuadro 1, la muestra cumple con los requisitos de ausencia de ***Staphylococcus aureus***.

Cuadro N° 1. Características Morfológicas de ***Staphylococcus aureus*** en Medio Agar Selectivo

MEDIO SELECTIVO	MORFOLOGÍA CARACTERÍSTICA DE LAS COLONIAS
Medio Agar Baird-Parker	Negro brillante, rodeado de zonas transparentes de 2 mm a 5 mm

4.8.2.1 Prueba de coagulasa para ***Staphylococcus aureus***.

- a) Transferir con la ayuda de un asa de inoculación, colonias sospechosas de la superficie del Medio Agar Baird-Parker a tubos individuales que contengan cada uno 0.5 mL de plasma.
- b) Incubar en un baño de agua a 37°C, y examinar los tubos a las 3 h y 24 h.
- c) Comprobar que no se formó coagulo en ninguno de los tubos luego del periodo de incubación. Si no se observa ningún grado de coagulación la muestra cumple con los requisitos para confirmar la ausencia de ***Staphylococcus aureus***.

4.8.3 Determinación de ausencia de ***Pseudomonas aeruginosa***. Ver Anexo N° 12

- a) Pesar asépticamente 1.0 g de muestra y suspender en 9.0 mL de Medio Líquido Digerido de Caseína y Soya, para obtener 10 mL, mezclar e incubar a una temperatura de 30 a 35°C durante 24 h.
- b) Utilizar un asa de inoculación y realizar estrías con una porción del medio Líquido Digerido de Caseína y Soya en la superficie del Medio Agar Cetrimida, contenido en placas Petri.

- c) Invertir e incubar las placas con el Medio Agar Cetrimida, a una temperatura de 30 a 35°C por un tiempo de 24 h.
- d) Examinar las placas y comprobar si se recuperaron colonias microbianas que se ajusten a la descripción dada en el cuadro 2, si ninguna de las placas llegase a contener colonias con las características enumeradas en el cuadro 2, la muestra cumple con los requisitos de ausencia de ***Pseudomonas aeruginosa***.

Cuadro N° 2. Características Morfológicas de ***Pseudomonas aeruginosa*** en Medio Agar Selectivo y de Diagnostico.

MEDIO SELECTIVO	MORFOLOGÍA CARACTERÍSTICA DE LAS COLONIAS	FLUORESCENCIA EN LUZ UV	PRUEBA DE OXIDASA
Medio Agar Cetrimida	Generalmente verdoso	Verdoso	Positivo

4.8.4 Determinación de ausencia ***Salmonella spp.*** Ver Anexo N° 14.

- a) Pesar asépticamente 1.0 g de muestra y suspender en 9.0 mL de Medio Líquido de Lactosa para obtener 10 mL, mezclar e incubar a una temperatura de 30 a 35°C durante 24 h.
- b) Pipetear porciones de 1.0 mL del Medio Líquido de Lactosa y transferir a tubos de ensayo que contengan 10 mL de Medio Líquido de Selenito-Cistina y Medio Líquido de Tetrionato, mezclar e incubar a una temperatura de 30 a 35°C durante 12 a 24 h.
- c) Utilizar un asa de inoculación y realizar estrías de los Medios Líquidos Selenito-Cistina y Tetrionato sobre la superficie del Medio Agar Xilosa

Lisina Desoxicolato (XLD) y del Medio Agar con Sulfito de Bismuto contenido en placas Petri.

- d) Invertir e incubar las placas con los Medios Agar Xilosa Lisina Desoxicolato y Agar con Sulfito de Bismuto, a una temperatura de 30 a 35 °C durante 12 a 24 h.
- e) Examinar las placas y se comprobar si se recuperaron colonias microbianas que se ajusten a la descripción del cuadro 3, de ser así proseguir con la prueba de identificación adicional, si ninguna de las placas llegase a contener colonias con las características enumeradas en el cuadro 3, la muestra cumple con los requisitos de ausencia de ***Salmonella spp.***

Cuadro N° 3. Características Morfológicas de ***Salmonella spp*** en Medio Agar Selectivo.

MEDIO SELECTIVO	MORFOLOGÍA CARACTERÍSTICA DE LAS COLONIAS
Medio Agar Xilosa Lisina Desoxicolato	De color rojo, con o sin centros negros
Medio Agar con Sulfito de Bismuto	De color negro o verde

4.8.4.1 Prueba adicional para determinar la ausencia de ***Salmonella spp.***

- a) Transferir con la ayuda de un asa de inoculación, colonias sospechosas representativas a un tubo inclinado de Medio Agar - Triple Azúcar – Hierro.
- b) Estriar la superficie inclinada y luego clavar el alambre bien por debajo de la superficie.
- c) Incubar a 30-35 °C por 24 h.

- d) Examinar el tubo, si no se hallan indicios de que los tubos presentan superficies alcalinas (rojas) y fondos ácidos (amarillos), (con o sin ennegrecimiento concomitante de los fondos debido a la producción de sulfuro de hidrogeno), la muestra cumple con los requisitos de ausencia de ***Salmonella spp.***

4.8.5 Determinación de ausencia de *Escherichia coli*. Ver Anexo N° 16.

- a) Pesar asépticamente 1.0 g de muestra y suspender en 9.0 mL de Medio Líquido de Lactosa para obtener 10 mL, mezclar e incubar a una temperatura de 30 a 35 °C durante 24 h.
- b) Utilizar un asa de inoculación y realizaron estrías con una porción del Medio Líquido de Lactosa sobre la superficie del Medio Agar Mac Conkey.
- c) Invertir e incubar las placas con el Medio Agar Mac Conkey a una temperatura de 30 a 35 °C durante 12 a 24 h.
- d) Examinar las placas y comprobar la recuperación de colonias microbianas que se ajusten a la descripción dada en el cuadro 4, en caso de recuperar colonias que presenten las características enumeradas, proceder con una identificación adicional, si ninguna de las colonias se ajusta a las características enumeradas, la muestra cumple con los requisitos de la ausencia de ***Escherichia coli***.

4.8.5.1 Prueba adicional para determinar la ausencia de *Escherichia coli*.

- a) Transferir las colonias sospechosas con la ayuda de un asa de inoculación, a la superficie del Medio Agar Levine con Eosina – Azul de Metileno colocado en placas de Petri.

NOTA: Si se debe transferir un número grande de colonias sospechosas, dividir la superficie de cada placa en cuadrantes e inocular cada uno con una colonia diferente.

- b) Cubrir las placas, invertir e incubar a 35 ± 2 °C durante no menos de tres días.
- c) Examinar las placas, si ninguna de las colonias exhibe las características descritas en el cuadro 4, la muestra cumple con los requisitos de la prueba para determinar la ausencia de *Escherichia coli*.

Cuadro N° 4. Características Morfológicas de *Escherichia coli* en Medio Agar Selectivo

MEDIO SELECTIVO	MORFOLOGÍA CARACTERÍSTICA DE LAS COLONIAS
Medio Agar Mac Conkey	De color rojo ladrillo, pueden tener una zona de bilis precipitada alrededor.
Medio Agar Levine con Eosina-Azul de Metileno (EMB)	Exhiben brillo metálico característico bajo luz reflejada, apariencia negra azulada bajo luz transmitida.

4.8.6 Recuento Total de Mohos y Levaduras (Método en Placa). Ver Anexo N° 18.

- a) Pesar asépticamente 1.0 g de muestra y suspender en 9.0 mL de solución amortiguadora de Fosfato pH 7.2 para obtener 10 mL. Hacer diluciones

decimales de 10^{-2} , y 10^{-3} , para que 1 mL permita obtener entre 30 y 300 colonias.

- b) Pipetear 1.0 mL de cada dilución y transferir a dos placas de Petri estériles; agregar inmediatamente, a cada placa, de 15 a 20 mL de Medio Agar Papa Dextrosa previamente fundido y enfriado a una temperatura aproximada de 45°C.
- c) Cubrir las placas de Petri y homogenizar la muestra rotando suavemente las placas sobre una superficie plana (técnica del ocho), dejar solidificar el contenido a temperatura ambiente.
- d) Invertir las placas de Petri e incubar durante 5 a 7 días a una temperatura ambiente.
- e) Examinar las placas al finalizar la incubación, para verificar crecimiento de microorganismos.
- f) Contar el número de colonias y expresar el promedio de las dos placas de cada dilución en términos del número de microorganismos por g (UFC/g) de muestra.

4.9 ENSAYO PRECLÍNICO DE LA ENZIMA PAPAÍNA LIOFILIZADA EN PACIENTES. ⁽⁶⁾

4.9.1 Método de aplicación de la enzima papaína liofilizada en cicatrices tipo queloide y verrugas.

- a) Medir las dimensiones de la cicatriz queloide o verruga y tomar una fotografía de la afección.

- b) Lavar con agua y jabón el área de la cicatriz o verruga.
- c) Limpiar el área de la cicatriz o verruga con alcohol 90° y dejar secar.
- d) Aplicar vaselina en el contorno de la cicatriz o verruga.
- e) Humedecer con agua la cicatriz tipo queloide o verruga y aplicar la enzima papaína liofilizada con ayuda de una microespátula, únicamente sobre la cicatriz o verruga.
- f) Una vez terminada la aplicación, colocar sobre la cicatriz o verruga un trozo de gasa y luego cubrir con un trozo de esparadrapo.
- g) Repetir el procedimiento una vez por semana durante cuatro semanas.

CAPITULO V
RESULTADOS
Y
DISCUSION DE LOS RESULTADOS

5.0 RESULTADOS

5.1 IDENTIFICACION DE LA ESPECIE VEGETAL. Ver Anexo N° 2.

Para la identificación de la especie vegetal, un ejemplar del fruto del papayo fue llevado a la Sección Técnica Científica del Jardín Botánico “La Laguna” donde fue inspeccionado y caracterizado por el curador, Licenciado Dagoberto Rodríguez.

5.2 RECOLECCION Y LIOFILIZACION DEL LATEX. Ver Anexos N° 3 y 4.

De 30 papayas se recolectaron 72 mL de látex, que al ser liofilizado produjeron 8.63 g de la enzima papaína.

5.3 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE LA ENZIMA PAPAINA LIOFILIZADA POR EL METODO MODIFICADO DE KUNITZ.

Para medir la actividad de la enzima papaína se utilizó el método modificado de Kunitz basado en el grado de hidrólisis de los substratos proteicos.

Las unidades de actividad (unidades Kunitz) es la actividad en la cual, bajo condiciones descritas, da un incremento en la absorbancia de 0.100. La actividad del material enzimático por gramo se obtiene de la ecuación 1:

$$\text{Ecuacion 1. Actividad} = \frac{E^{15} - E^0}{C} \times 10^4$$

Dónde: C: Es la concentración de la solución enzimática original en mg/mL
 E¹⁵: Es la Absorbancia después de 15 minutos de reacción.
 E⁰: Absorbancia inicial.

5.3.1 Ensayo de la actividad enzimática en función del pH a temperatura constante de 40 °C.

Tabla N° 4. Actividad de la enzima papaína liofilizada frente a cambios de pH a temperatura constante de 40 °C.

pH DEL SUSTRATO	ACTIVIDAD DE LA ENZIMA PAPAÍNA LIOFILIZADA (UNIDADES KUNITZ)	ACTIVIDAD DE LA ENZIMA PAPAÍNA LIOFILIZADA (%)
4.5	2.485×10^4	91.90
5.5	2.704×10^4	100.00
6.0	2.263×10^4	83.69
9.0	0.089×10^4	3.31

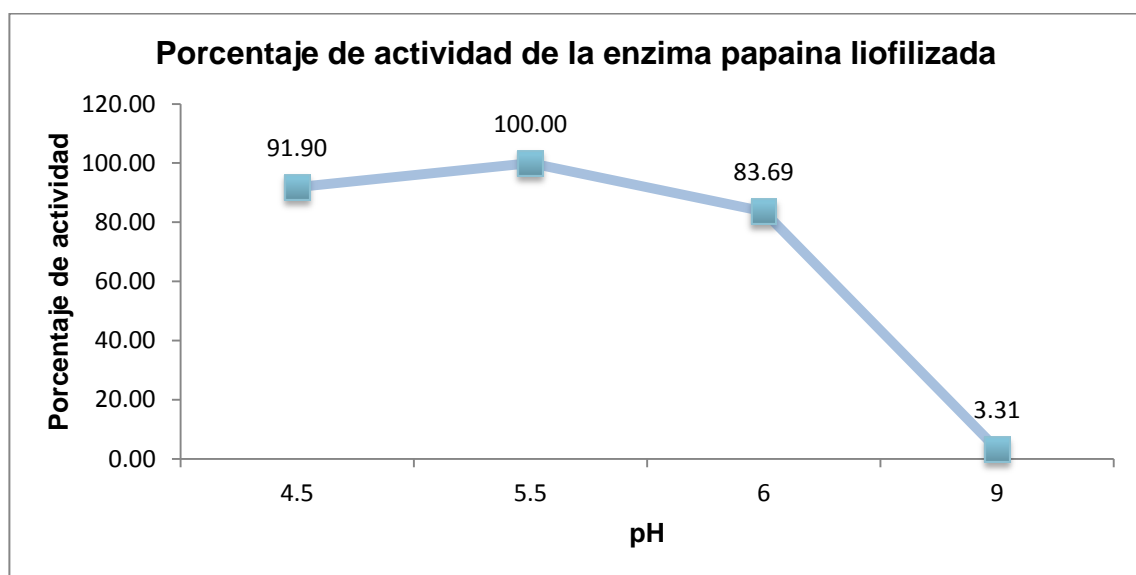


Figura N° 9. Grafica de los resultados de la actividad enzimática a diferentes pH a temperatura constante de 40° C.

En la tabla N° 4 se muestran los resultados de la actividad proteolítica de la enzima papaína liofilizada en unidades Kunitz y en porcentaje a diferentes pH y en la figura N° 9 se graficó el porcentaje de actividad proteolítica de la enzima papaína liofilizada a diferentes pH y temperatura constante de 40 °C. Se observa que la enzima papaína liofilizada presenta un máximo de 100% de actividad proteolítica a pH 5.5 y una importante merma a pH alcalino.

Considerando que la piel presenta un carácter ácido, al aplicar la enzima papaína liofilizada sobre las cicatrices tipo queloides y verrugas, esta se verá favorecida por el pH del entorno para presentar una actividad proteolítica óptima.

5.3.2 Ensayo de la actividad enzimática en función de la temperatura a pH constante de 5.5.

Tabla N° 5. Actividad proteolítica de la enzima papaína liofilizada frente a los cambios de temperatura a pH constante de 5.5.

TEMPERATURA DEL SUSTRATO (°C)	ACTIVIDAD DE LA ENZIMA PAPAÍNA LIOFILIZADA (UNIDADES KUNITZ)	ACTIVIDAD DE LA ENZIMA PAPAÍNA LIOFILIZADA (%)
32	2.234×10^4	66.39
37	2.880×10^4	85.59
42	3.365×10^4	100.00

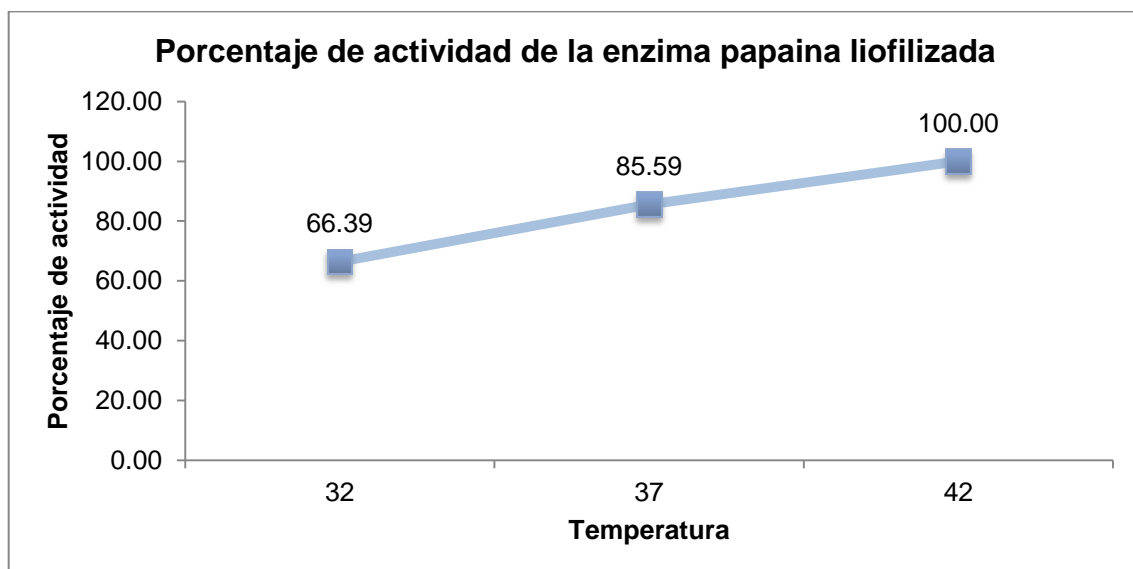


Figura N° 10. Gráfica de los resultados de la actividad enzimática a diferentes temperaturas a pH constante de 5.5.

En la tabla N° 5 se muestran los resultados de la actividad proteolítica de la enzima papaína a diferentes temperaturas y pH constante de 5.5 y en la figura N° 10 se graficó el porcentaje de actividad proteolítica a diferentes temperaturas y pH constante de 5.5. Se observa que la enzima papaína liofilizada presenta un máximo de 100% de actividad proteolítica a temperatura de 42 °C.

Es de destacar que la temperatura corporal promedio humana es de 37 °C. Por lo que al aplicar la enzima liofilizada sobre las cicatrices tipo queloide y verrugas, esta se verá favorecida por la temperatura del entorno para ejercer una importante actividad proteolítica de 85.59%.

5.4 DETERMINACION DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA ENZIMA PAPAÍNA LIOFILIZADA.

5.4.1 Resumen de los resultados de los ensayos de límites microbianos.

Cuadro N° 5. Resumen de los resultados de los ensayos de límites microbianos.

DETERMINACION	ESPECIFICACION	ESPECIFICACION	RESULTADO
	USP ⁽²²⁾	RTCA ⁽²¹⁾	
Recuento total de microorganismos aerobios (Método en placa).	No debe exceder de 100 UFC/g de muestra	$\leq 10^2$	Menor de 10 UFC/g de muestra
Determinación de ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia	Ausente	Conforme
Determinación de ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausencia	Ausente	Conforme
Determinación de ausencia de <i>Salmonella spp</i>	Ausencia	----	Conforme

Cuadro N° 5 (Continuación)

Determinación de ausencia de <i>Escherichia coli</i>	Ausencia	----	Conforme
Recuento total de hongos y levaduras (Método en placa)	No debe exceder de 50 UFC/g de muestra	$\leq 10^2$	Menor de 10 UFC/g de muestra

El cuadro N° 5 presenta las especificaciones de los ensayos de límites microbianos según la USP y el Reglamento Técnico Centroamericano, así como también el resultado obtenido en cada determinación.

5.4.2 Recuento total de microorganismos aerobios (método en placa). Ver Anexo N° 9.

En el recuento total de microorganismos aerobios (método en placa) con diluciones 10^{-1} , 10^{-2} ni 10^{-3} , no se recuperaron colonias microbianas sobre la superficie del Medio Agar Digerido de Caseína y Soya. Por no haber crecimiento en las placas que representaban la dilución inicial 10^{-1} , el resultado se expresa como menos de 10 UFC por g de muestra, por lo que la enzima papaína liofilizada cumple con los requerimientos especificados de no exceder las 100 UFC por g de muestra.

5.4.3 Determinación de ausencia de *Staphylococcus aureus*. Ver Anexo N° 11.

En la determinación de ausencia de *Staphylococcus aureus*, sobre la superficie del Medio Agar Baird-Parker se recuperaron colonias microbianas, por lo que se realizó la subsecuente prueba de Coagulasa, en esta última no se formaron coágulos en ninguno de los tubos, por lo tanto la enzima papaína

cumple con el requerimiento especificado de ausencia total de ***Staphylococcus aureus***.

5.4.4 Determinación de ausencia de *Pseudomonas aeruginosa*. Ver Anexo N° 13.

En la determinación de ausencia de ***Pseudomonas aeruginosa***, sobre la superficie del Medio Agar Cetrimida no se recuperaron colonias microbianas, por lo que no se realizó la subsecuente prueba de Oxidasa y de Pigmentos, por lo tanto la enzima papaína cumple con el requerimiento especificado de ausencia total de ***Pseudomonas aeruginosa***.

5.4.5 Determinación de ausencia *Salmonella spp.* Ver Anexo N° 15.

En la determinación de ausencia de ***Salmonella spp.***, sobre las superficies del Medio Agar XLD y del Medio Agar Sulfito de Bismuto, no se recuperaron colonias microbianas, por lo tanto la enzima papaína cumple con el requerimiento especificado de ausencia total de ***Salmonella spp.***

5.4.6 Determinación de ausencia de *Escherichia coli*. Ver Anexo N° 17.

En la determinación de ausencia de ***Escherichia coli***, sobre la superficie del Medio Agar Levine con Eosina-Azul de Metileno no se recuperaron colonias microbianas, por lo tanto la enzima papaína cumple con el requerimiento especificado de ausencia total de ***Escherichia coli***.

5.4.7 Recuento Total de Hongos y Levaduras (Método en Placa). Ver Anexo N° 19.

En el recuento total de Hongos y Levaduras (Método en Placa) con diluciones 10^{-1} , 10^{-2} ni 10^{-3} , no se recuperaron colonias microbianas sobre la superficie del Medio Agar Papa Dextrosa. Por no haber crecimiento en las placas que representaban la dilución inicial 10^{-1} , el resultado se expresa como menos de 10 UFC por g de muestra, por lo que la enzima papaína liofilizada cumple con los requerimientos especificados de no exceder las 50 UFC por g de muestra.

Los recuentos totales de microorganismos aerobios y de hongos y levaduras, fueron en ambos casos, menores al límite especificado, estos límites son los establecidos para el talco en polvo, el cual es de uso tópico, por esta razón en este ensayo se utilizaron estos mismos límites para la enzima liofilizada.

En cuanto a las determinaciones de microorganismos patógenos, estos estuvieron ausentes en todos los ensayos, y solamente en la determinación de ***Staphylococcus aureus*** se realizó una prueba adicional por la posible presencia de este microorganismo, posibilidad planteada luego de recuperar colonias en el Medio Agar Baird-Parker, posteriormente con la prueba de la coagulasa se comprobó que el microorganismo en cuestión no se trataba de ***Staphylococcus aureus***, lo que sugiere que la razón del crecimiento de colonias microbianas en el Medio Agar Baird-Parker, se deba a una contaminación en la realización del ensayo.

Los resultados de los recuentos de microorganismos y determinaciones de ausencia de microorganismos patógenos, demuestran que la calidad microbiológica de la enzima liofilizada es muy buena, esto comprueba que las condiciones en que se realizó la extracción del látex fueron asépticas e impidieron la proliferación de microorganismos, además el proceso de la

lío-filización implica un congelamiento de la muestra a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, y la enzima una vez liofilizada no contiene agua, lo cual hace muy desfavorable el crecimiento de microorganismos en la enzima papaína liofilizada.

Los resultados permiten afirmar que la enzima papaína liofilizada no constituye ningún riesgo microbiológico para su aplicación en los pacientes.

5.5 APLICACION LA ENZIMA PAPAÍNA LIOFILIZADA EN PACIENTES SELECCIONADOS CON CICATRICES TIPO QUELOIDE O VERRUGAS.

Para la aplicación de la enzima papaína liofilizada, fue asignado un código a cada paciente para facilitar su identificación.

Cuadro N° 6. Códigos de los pacientes, afección que presentaban y tratamiento aplicado.

CODIGO DEL PACIENTE	TIPO DE AFECCION	TRATAMIENTO
PQ01	Cicatriz Queloide	Enzima papaína
PQ02	Cicatriz Queloide	Enzima papaína
PQ03	Cicatriz Queloide	Enzima papaína
PQ04	Cicatriz Queloide	Enzima papaína
PQ05	Cicatriz Queloide	Enzima papaína
PQ06	Cicatriz Queloide	Enzima papaína
PQ07	Cicatriz Queloide	Enzima papaína
PQ08	Cicatriz Queloide	Enzima papaína
PQ09	Cicatriz Queloide	Enzima papaína
PQ10	Cicatriz Queloide	Contractubex®
PV01	Verruga	Enzima papaína
PV02	Verruga	Enzima papaína
PV03	Verruga	Enzima papaína
PV04	Verruga	Enzima papaína
PV05	Verruga	Callosil®

El cuadro N°6 muestra el código de identificación de cada paciente y según este, se identificaba si tenía una cicatriz queloide o verruga, los pacientes de código PQ01 hasta PQ09 presentaban cicatrices queloides y se les aplicó la enzima papaína liofilizada, el paciente PQ10 presentaba una cicatriz queloide y se le aplicó el medicamento Contractubex®.

Los pacientes de código PV01 hasta PV04 presentaban verrugas y se les aplicó la enzima liofilizada, el paciente PV05 presentaba una verruga y se le aplicó el medicamento Callosil®. Cabe mencionar que en este punto se contó con la valiosa ayuda del Dr. Carlos Alberto Galdámez de la Facultad de Química y Farmacia para la correcta identificación de las verrugas.

Tanto los pacientes que presentaron cicatrices queloides como los que presentaron verrugas y fueron tratados con la enzima papaína, firmaron una carta de consentimiento informado (Ver anexo N°20).

Las dimensiones de la cicatriz queloide o verruga se midieron y estos datos se anotaron en un cuadro de recolección de datos (Ver anexo 21), con estos resultados se calculó el delta de disminución de cada paciente que es la diferencia entre las dimensiones iniciales antes del tratamiento y las dimensiones finales de la cicatriz queloide o verruga después del tratamiento. También se fotografió la cicatriz o verruga antes y después de las aplicaciones, con el fin de apreciar posibles cambios en la apariencia de estas. Por último se preguntó a cada paciente sobre cualquier reacción o efecto que se manifestara en la zona de aplicación, tales como prurito, irritación o alergia, puesto que en caso de marcados efectos adversos, se procedería a finalizar el tratamiento además se preguntó a cada paciente si observo algún cambio en el aspecto o en las dimensiones de la cicatriz tipo queloide o de la verruga.

Junto a las fotografías de los pacientes se encuentra un esquema de la localización de la cicatriz o verruga, en estos esquemas un punto rojo solido indica que la afección está en la vista anterior del esquema, un punto rojo hueco indica que la afección está en la vista posterior del esquema.

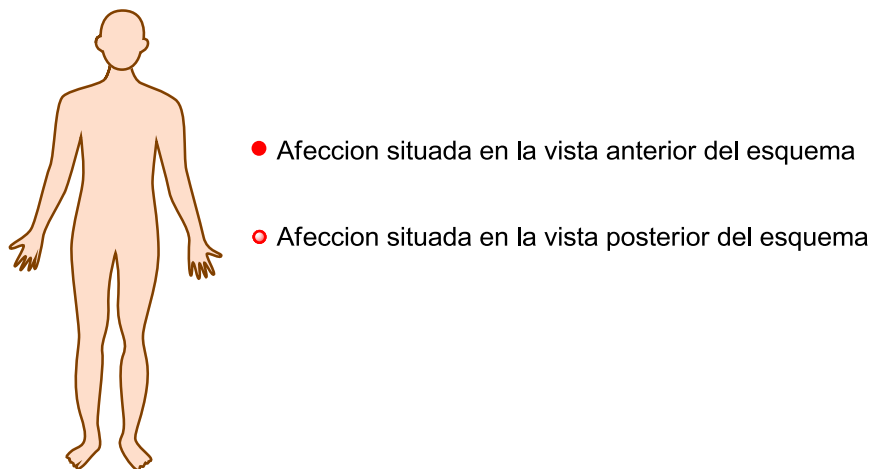


Figura N° 11. Diagrama de localización de las Cicatrices y Verrugas.

5.5.1 Resultados de la aplicación de la enzima papaína a los pacientes con cicatrices tipo queloide.

A continuación se muestran las fotografías, tablas y graficas con los resultados obtenidos de cada uno de los pacientes tratados con la enzima papaína y el paciente tratado con Contractubex[®].

- **Paciente PQ01**

Tabla N° 6. Resultados de las mediciones de la cicatriz tipo queuloide del paciente PQ01 antes y después de las aplicaciones de la enzima papaína.

PARAMETRO	APLICACIÓN EN QUE SE MIDIÓ LA CICATRIZ QUEULOIDE					DELTA DE DISMINUCIÓN
	Antes	Después	Después	Después	Después	
	1°	1°	2°	3°	4°	
LARGO (cm)	5.250	5.185	5.155	5.110	5.135	0.115
ANCHO (cm)	1.305	1.265	1.240	1.155	1.225	0.050
ALTO (cm)	0.200	0.220	0.205	0.200	0.205	- 0.005

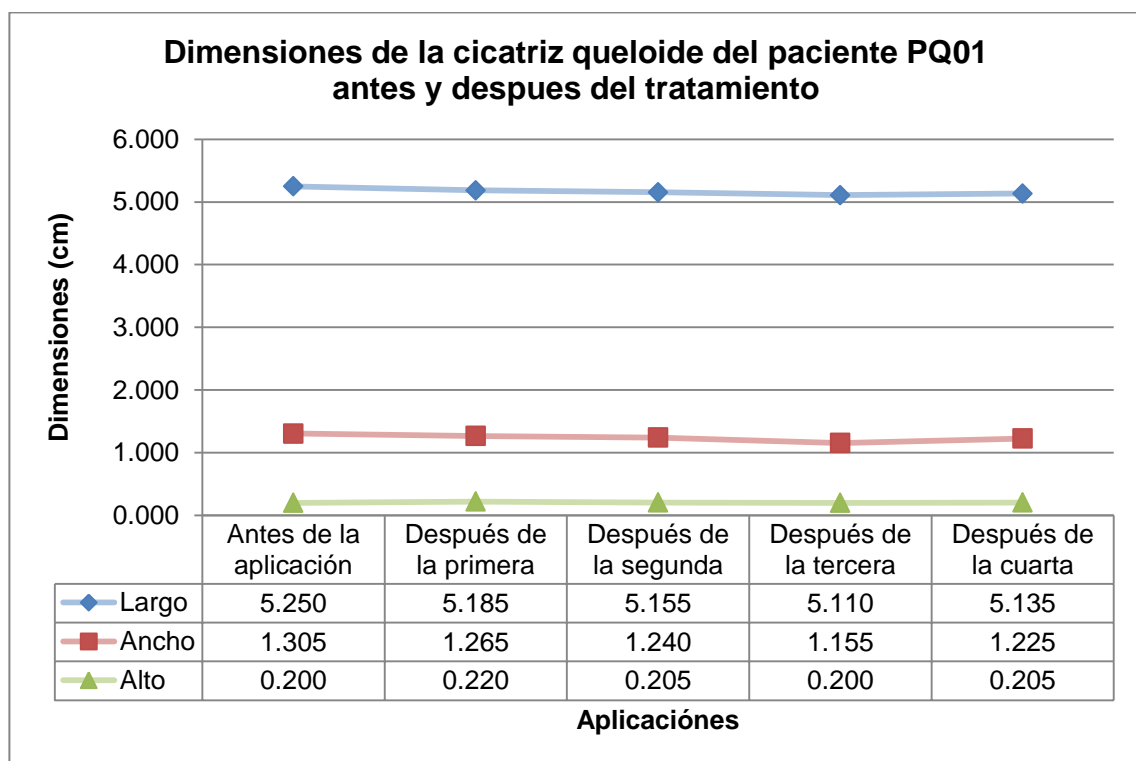
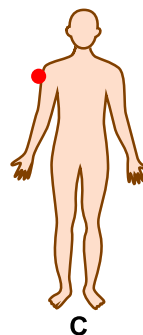


Figura N° 12. Dimensiones de la cicatriz queuloide del paciente PQ01 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína.



- A: Cicatriz queloide antes del tratamiento con la enzima papaína.
- B: Cicatriz queloide después del tratamiento con la enzima papaína.
- C: Localización de la cicatriz queloide.

Figura N° 13. Fotografías de la cicatriz queloide del paciente PQ01 antes y después del tratamiento y localización de la cicatriz.

Efectos secundarios descritos por el paciente: El paciente manifestó intenso prurito sobre el área de aplicación, se observaron múltiples zonas de proteólisis luego de la tercera aplicación de la enzima papaína liofilizada.

La tabla N° 6 muestra los resultados de las mediciones de las dimensiones de la cicatriz queloide del paciente PQ01 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína liofilizada y en la figura 4 se graficaron dichas dimensiones. Al final del tratamiento se observa una disminución del largo de 5.250 a 5.130, del ancho de 1.305 a 1.225, en el alto se observó un aumento de 0.200 a 0.205, esto último se atribuye a un error en la medición por ser el parámetro más difícil de medir. Estos resultados evidencian la actividad proteolítica de la enzima papaína liofilizada en el caso del paciente PQ01.

- **Paciente PQ02**

Tabla N° 7. Resultados de las mediciones de la cicatriz tipo queloide del paciente PQ02 antes y después de las aplicaciones de la enzima papaína.

PARAMETRO	APLICACIÓN EN QUE SE MIDIÓ LA CICATRIZ QUELOIDE					DELTA DE DISMINUCIÓN
	Antes	Después	Después	Después	Después	
	1°	1°	2°	3°	4°	
LARGO (cm)	3.280	3.290	3.265	3.260	3.140	0.140
ANCHO (cm)	1.280	1.315	1.190	1.180	1.205	0.075
ALTO (cm)	0.145	0.185	0.135	0.220	0.115	0.030

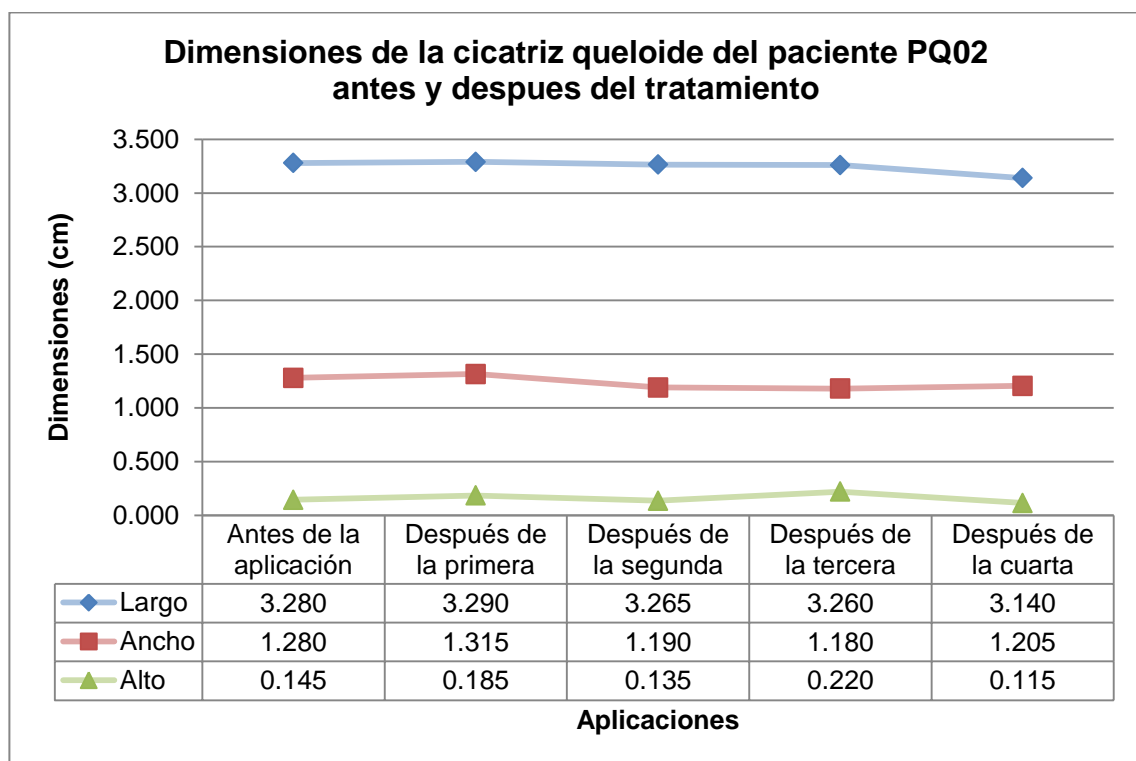
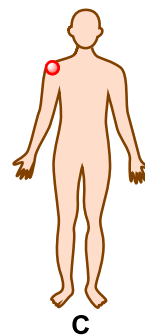


Figura N° 14. Dimensiones de la cicatriz queloide del paciente PQ02 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína.



- A:** Cicatriz queloide antes del tratamiento con la enzima papaína.
- B:** Cicatriz queloide despues del tratamiento con la enzima papaína.
- C:** Localización de la cicatriz queloide.

Figura N° 15. Fotografías de la cicatriz queloide del paciente PQ02 antes y después del tratamiento y localización de la cicatriz.

Efectos secundarios descritos por el paciente: El paciente manifestó intenso prurito sobre el área de aplicación, se observó una zona de proteólisis luego de la cuarta aplicación de la enzima papaína liofilizada.

La tabla N°7 muestra los resultados de las mediciones de las dimensiones de la cicatriz queloide del paciente PQ02 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína liofilizada y en la figura 6 se graficaron dichas dimensiones. Al final del tratamiento se observa una disminución del largo de 3.280 a 3.140, del ancho de 1.280 a 1.205 y del alto de 0.145 a 0.115. Estos resultados evidencian la actividad proteolítica de la enzima papaína liofilizada en el caso del paciente PQ02.

- **Paciente PQ03**

Tabla N° 8. Resultados de las mediciones de la cicatriz tipo queoide del paciente PQ03 antes y después de las aplicaciones de la enzima papaína.

PARAMETRO	APLICACIÓN EN QUE SE MIDIÓ LA CICATRIZ QUELOIDE					DELTA DE DISMINUCIÓN
	Antes	Después	Después	Después	Después	
	1°	1°	2°	3°	4°	
LARGO (cm)	4.050	4.050	4.050	4.040	4.030	0.020
ANCHO (cm)	1.145	1.135	1.135	1.130	1.125	0.020
ALTO (cm)	0.050	0.055	0.040	0.040	0.035	0.015

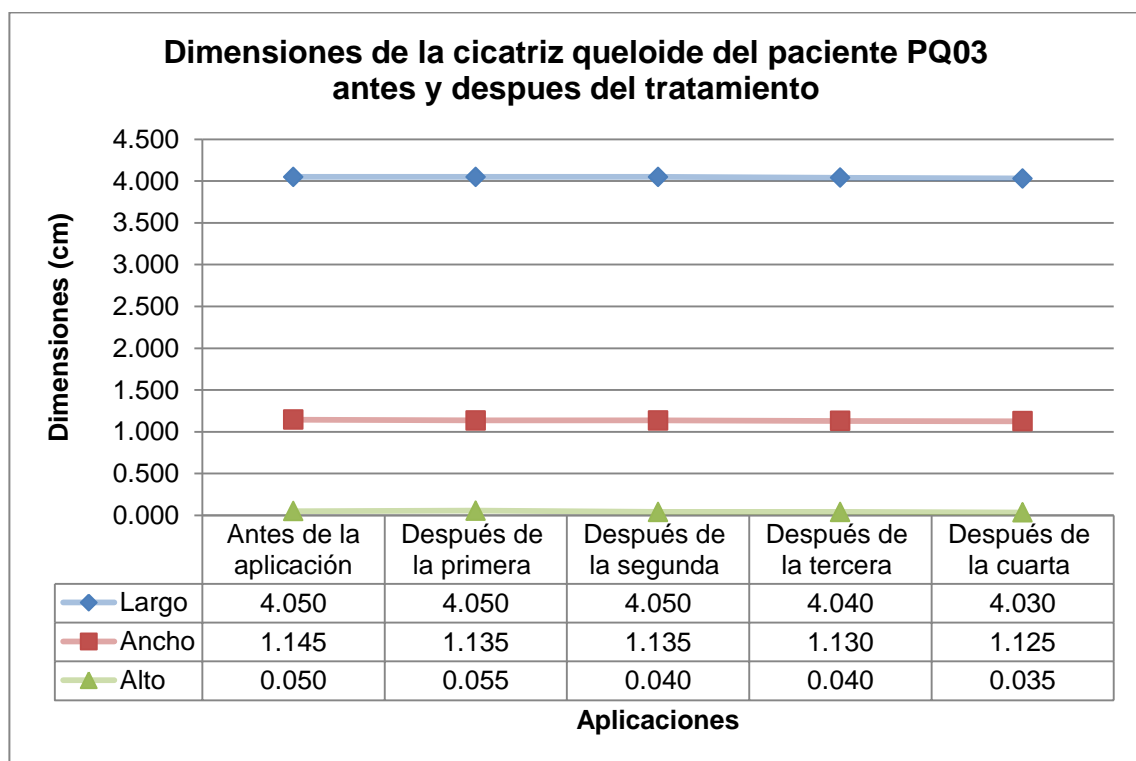
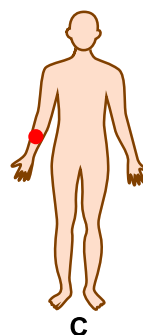


Figura N° 16. Dimensiones de la cicatriz queoide del paciente PQ03 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína.



- A:** Cicatriz queloide antes del tratamiento con la enzima papaína.
- B:** Cicatriz queloide despues del tratamiento con la enzima papaína.
- C:** Localización de la cicatriz queloide.

Figura N° 17. Fotografías de la cicatriz queloide del paciente PQ03 antes y después del tratamiento y localización de la cicatriz.

Efectos secundarios descritos por el paciente: El paciente manifestó intenso prurito sobre el área de aplicación.

La tabla N° 8 muestra los resultados de las mediciones de las dimensiones de la cicatriz queloide del paciente PQ03 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína liofilizada y en la figura 8 se graficaron dichas dimensiones. Al final del tratamiento se observa una disminución del largo de 4.050 a 4.030, del ancho de 1.145 a 1.125 y del alto de 0.050 a 0.035. Estos resultados evidencian la actividad proteolítica de la enzima papaína liofilizada en el caso del paciente PQ03.

Paciente PQ04

Tabla N° 9. Resultados de las mediciones de la cicatriz tipo queloide del paciente PQ04 antes y después de las aplicaciones de la enzima papaína.

PARAMETRO	APLICACIÓN EN QUE SE MIDIÓ LA CICATRIZ QUELOIDE					DELTA DE DISMINUCIÓN
	Antes	Después	Después	Después	Después	
	1°	1°	2°	3°	4°	
LARGO (cm)	4.075	4.015	3.995	3.915	3.915	0.160
ANCHO (cm)	0.625	0.595	0.600	0.600	0.530	0.095
ALTO (cm)	0.110	0.090	0.065	0.050	0.060	0.050

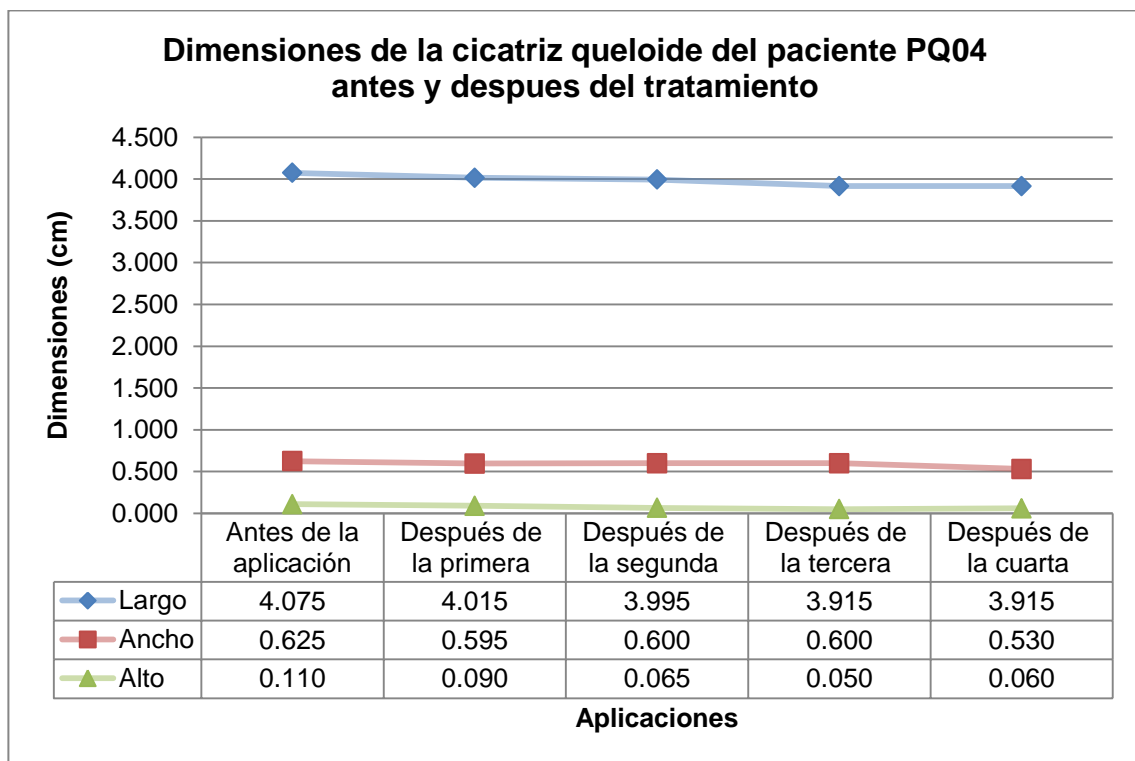
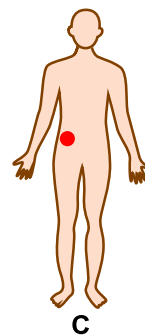


Figura N° 18. Dimensiones de la cicatriz queloide del paciente PQ04 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína.



- A:** Cicatriz queloide antes del tratamiento con la enzima papaína.
- B:** Cicatriz queloide después del tratamiento con la enzima papaína.
- C:** Localización de la cicatriz queloide.

Figura N° 19. Fotografías de la cicatriz queloide del paciente PQ04 antes y después del tratamiento y localización de la cicatriz.

Efectos secundarios descritos por el paciente: El paciente manifestó intenso prurito sobre el área de aplicación y decoloración de cicatriz queloide.

La tabla N° 9 muestra los resultados de las mediciones de las dimensiones de la cicatriz queloide del paciente PQ04 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína liofilizada y en la figura 10 se graficaron dichas dimensiones. Al final del tratamiento se observa una disminución del largo de 4.075 a 3.915, del ancho de 0.625 a 0.530 y del alto de 0.110 a 0.060. Estos resultados evidencian la actividad proteolítica de la enzima papaína liofilizada en el caso del paciente PQ04.

- **Paciente PQ05**

Tabla N° 10. Resultados de las mediciones de la cicatriz tipo queloide del paciente PQ05 antes y después de las aplicaciones de la enzima papaína.

PARAMETRO	APLICACIÓN EN QUE SE MIDIÓ LA CICATRIZ QUELOIDE					DELTA DE DISMINUCIÓN
	Antes 1°	Después 1°	Después 2°	Después 3°	Después 4°	
LARGO (cm)	5.800	5.700	5.600	5.500	5.500	0.300
ANCHO (cm)	1.700	1.400	1.400	1.300	1.100	0.600
ALTO (cm)	0.300	0.200	0.200	0.200	0.200	0.100

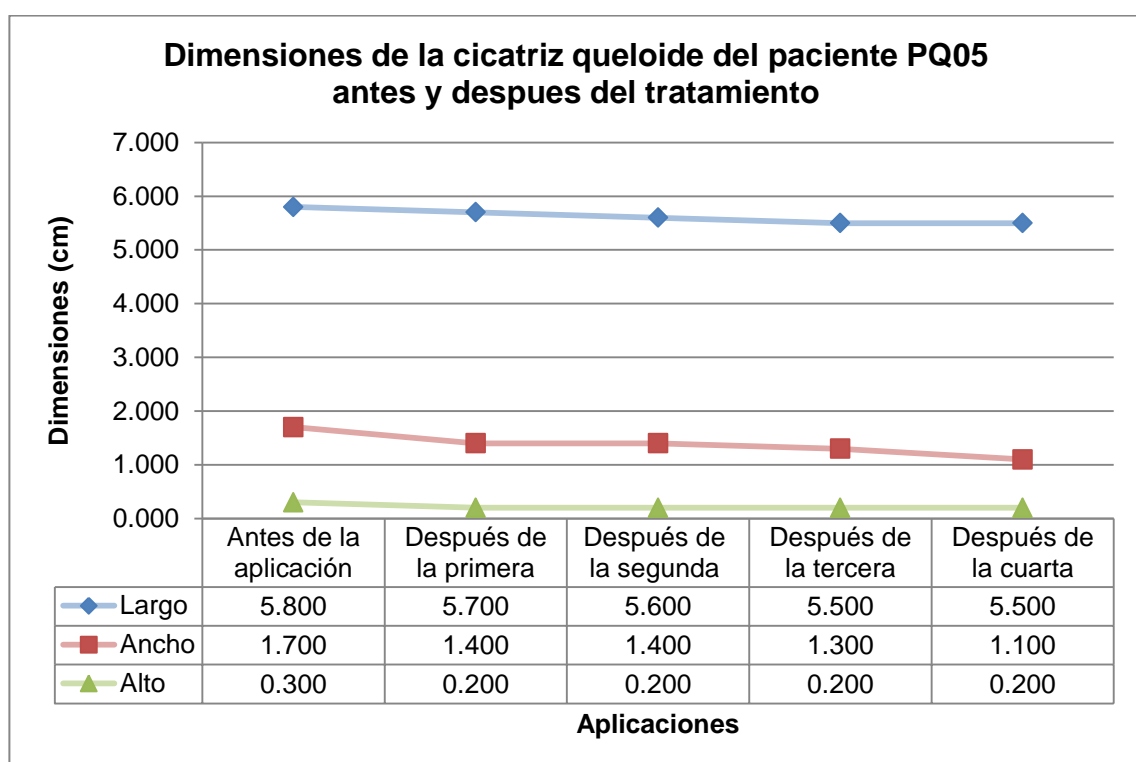
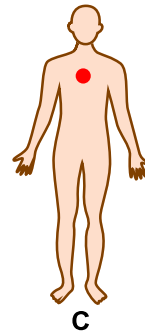


Figura N° 20. Dimensiones de la cicatriz queloide del paciente PQ05 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína.



- A:** Cicatriz queloide antes del tratamiento con la enzima papaína.
- B:** Cicatriz queloide después del tratamiento con la enzima papaína.
- C:** Localización de la cicatriz queloide.

Figura N° 21. Fotografías de la cicatriz queloide del paciente PQ05 antes y después del tratamiento y localización de la cicatriz.

Efectos secundarios descritos por el paciente: El paciente manifestó decoloración de la cicatriz queloide y la desaparición de estrías circundantes de la cicatriz, también manifestó que antes de la aplicación el queloide le causaba dolor, y que estos habían desaparecido luego del tratamiento.

La tabla N° 10 muestra los resultados de las mediciones de las dimensiones de la cicatriz queloide del paciente PQ05 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína liofilizada y en la figura 12 se graficaron dichas dimensiones. Al final del tratamiento se observa una disminución del largo de 5.800 a 5.500, del ancho de 1.700 a 1.100 y del alto de 0.300 a 0.200. Estos resultados evidencian la actividad proteolítica de la enzima papaína liofilizada en el caso del paciente PQ05.

- **Paciente PQ06**

Tabla N° 11. Resultados de las mediciones de la cicatriz tipo queloide del paciente PQ06 antes y después de las aplicaciones de la enzima papaína.

PARAMETRO	APLICACIÓN EN QUE SE MIDIÓ LA CICATRIZ QUELOIDE					DELTA DE DISMINUCIÓN
	Antes	Después	Después	Después	Después	
	1°	1°	2°	3°	4°	
LARGO (cm)	6.060	6.055	6.030	6.045	6.000	0.060
ANCHO (cm)	1.280	1.280	1.280	1.250	1.215	0.065
ALTO (cm)	0.075	0.070	0.070	0.060	0.060	0.015

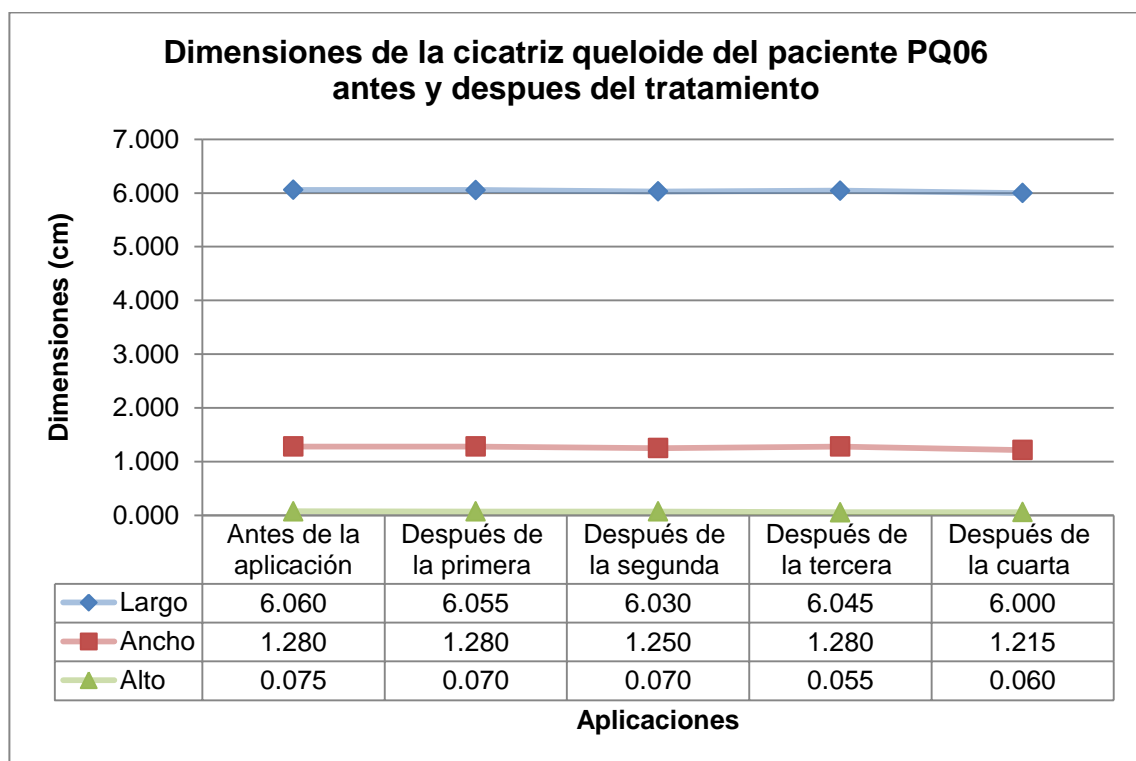
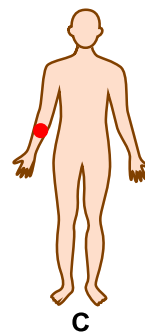


Figura N° 22. Gráfico de las dimensiones de la cicatriz queloide del paciente PQ06 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína.



- A:** Cicatriz queloide antes del tratamiento con la enzima papaína.
- B:** Cicatriz queloide después del tratamiento con la enzima papaína.
- C:** Localización de la cicatriz queloide.

Figura N° 23. Fotografías de la cicatriz queloide del paciente PQ06 antes y después del tratamiento y localización de la cicatriz.

Efectos secundarios descritos por el paciente: Ninguno.

La tabla N° 11 muestra los resultados de las mediciones de las dimensiones de la cicatriz queloide del paciente PQ06 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína liofilizada y en la figura 14 se graficaron dichas dimensiones. Al final del tratamiento se observa una disminución del largo de 6.060 a 6.000, del ancho de 1.280 a 1.215 y del alto de 0.075 a 0.060. Estos resultados evidencian la actividad proteolítica de la enzima papaína liofilizada en el caso del paciente PQ06.

- **Paciente PQ07**

Tabla N° 12. Resultados de las mediciones de la cicatriz tipo queoide del paciente PQ07 antes y después de las aplicaciones de la enzima papaína.

PARAMETRO	APLICACIÓN EN QUE SE MIDIÓ LA CICATRIZ QUEOIDE					DELTA DE DISMINUCIÓN
	Antes	Después	Después	Después	Después	
	1°	1°	2°	3°	4°	
LARGO (cm)	10.815	10.805	10.720	10.735	10.735	0.080
ANCHO (cm)	0.835	0.810	0.730	0.790	0.775	0.060
ALTO (cm)	0.220	0.220	0.200	0.210	0.200	0.020

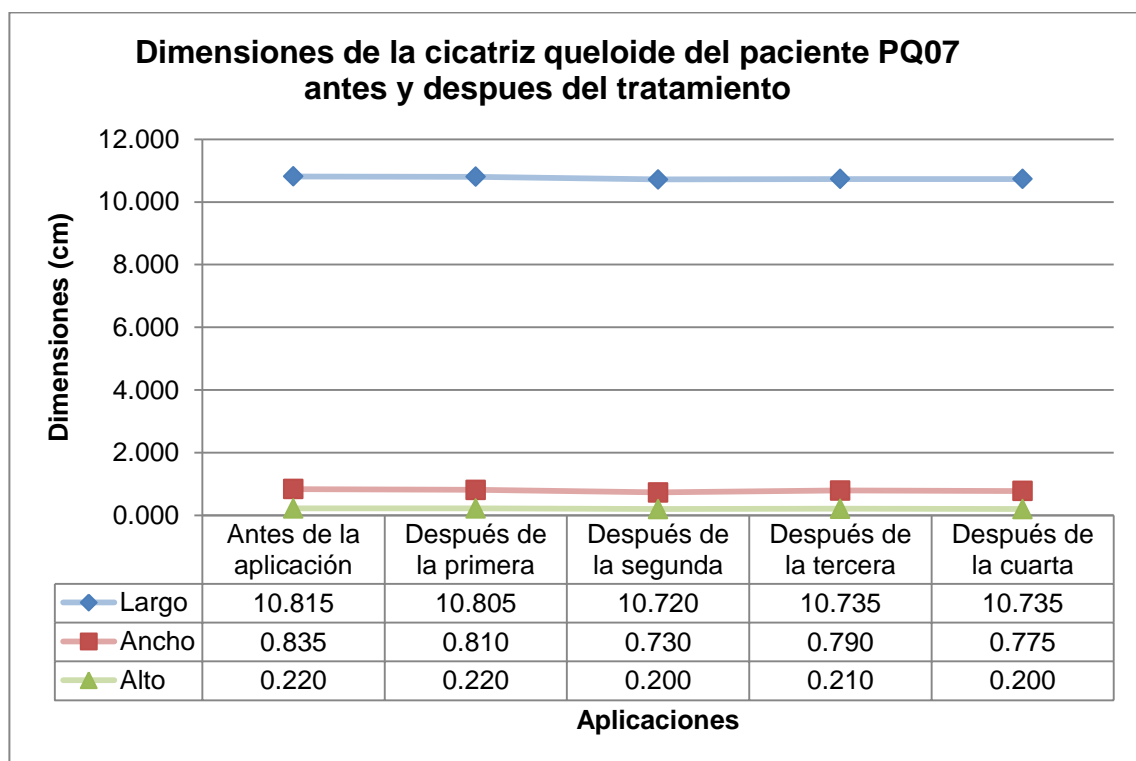
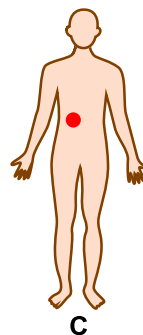


Figura N° 24. Dimensiones de la cicatriz queoide del paciente PQ07 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína.



- A:** Cicatriz queloide antes del tratamiento con la enzima papaína.
- B:** Cicatriz queloide después del tratamiento con la enzima papaína.
- C:** Localización de la cicatriz queloide.

Figura N° 25. Fotografías de la cicatriz queloide del paciente PQ07 antes y después del tratamiento y localización de la cicatriz.

Efectos secundarios descritos por el paciente: El paciente manifestó intenso prurito sobre el área de aplicación.

La tabla N° 12 muestra los resultados de las mediciones de las dimensiones de la cicatriz queloide del paciente PQ07 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína liofilizada y en la figura 16 se graficaron dichas dimensiones. Al final del tratamiento se observa una disminución del largo de 10.815 a 10.735, del ancho de 0.835 a 0.775 y del alto de 0.220 a 0.200. Estos resultados evidencian la actividad proteolítica de la enzima papaína liofilizada en el caso del paciente PQ07.

- **Paciente PQ08**

Tabla N° 13. Resultados de las mediciones de la cicatriz tipo queloide del paciente PQ08 antes y después de las aplicaciones de la enzima papaína.

PARAMETRO	APLICACIÓN EN QUE SE MIDIÓ LA CICATRIZ QUELOIDE					DELTA DE DISMINUCIÓN
	Antes	Después	Después	Después	Después	
	1°	1°	2°	3°	4°	
LARGO (cm)	3.075	2.965	2.905	2.940	2.955	0.120
ANCHO (cm)	0.725	0.680	0.665	0.635	0.695	0.030
ALTO (cm)	0.135	0.110	0.100	0.120	0.120	0.015

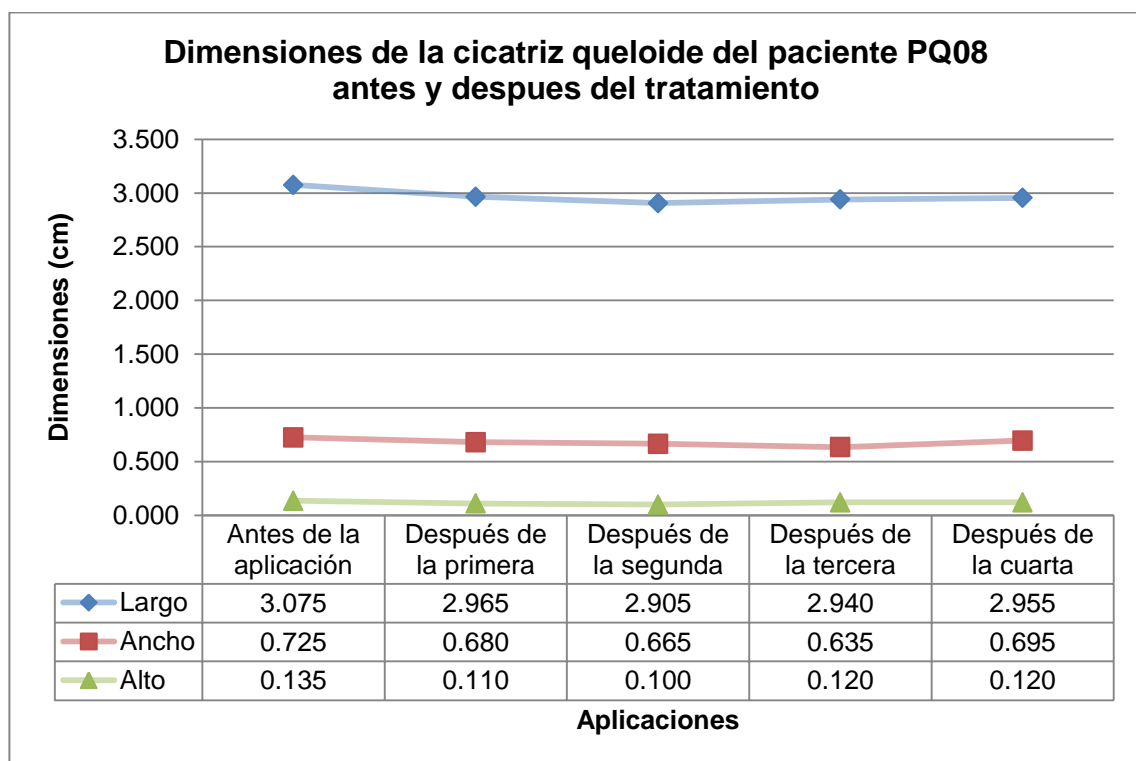
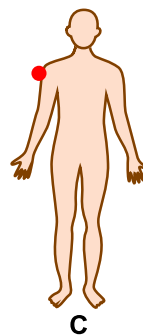


Figura N° 26. Dimensiones de la cicatriz queloide del paciente PQ08 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína.



- A:** Cicatriz queloide antes del tratamiento con la enzima papaína.
- B:** Cicatriz queloide después del tratamiento con la enzima papaína.
- C:** Localización de la cicatriz queloide.

Figura N° 27. Fotografías de la cicatriz queloide del paciente PQ08 antes y después del tratamiento y localización de la cicatriz.

Efectos secundarios descritos por el paciente: El paciente manifestó intenso prurito sobre el área de aplicación, decoloración y ligera disminución de las dimensiones de la cicatriz queloide.

La tabla N° 13 muestra los resultados de las mediciones de las dimensiones de la cicatriz queloide del paciente PQ08 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína liofilizada y en la figura 18 se graficaron dichas dimensiones. Al final del tratamiento se observa una disminución del largo de 3.075 a 2.955, del ancho de 0.725 a 0.695 y del alto de 0.135 a 0.120. Estos resultados evidencian la actividad proteolítica de la enzima papaína liofilizada en el caso del paciente PQ08.

- **Paciente PQ09**

Tabla N° 14. Resultados de las mediciones de la cicatriz tipo queloide del paciente PQ09 antes y después de las aplicaciones de la enzima papaína.

PARAMETRO	APLICACIÓN EN QUE SE MIDIÓ LA CICATRIZ QUELOIDE					DELTA DE DISMINUCIÓN
	Antes	Después	Después	Después	Después	
	1°	1°	2°	3°	4°	
LARGO (cm)	2.345	2.355	2.335	2.325	2.320	0.025
ANCHO (cm)	1.865	1.855	1.860	1.850	1.860	0.005
ALTO (cm)	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.000

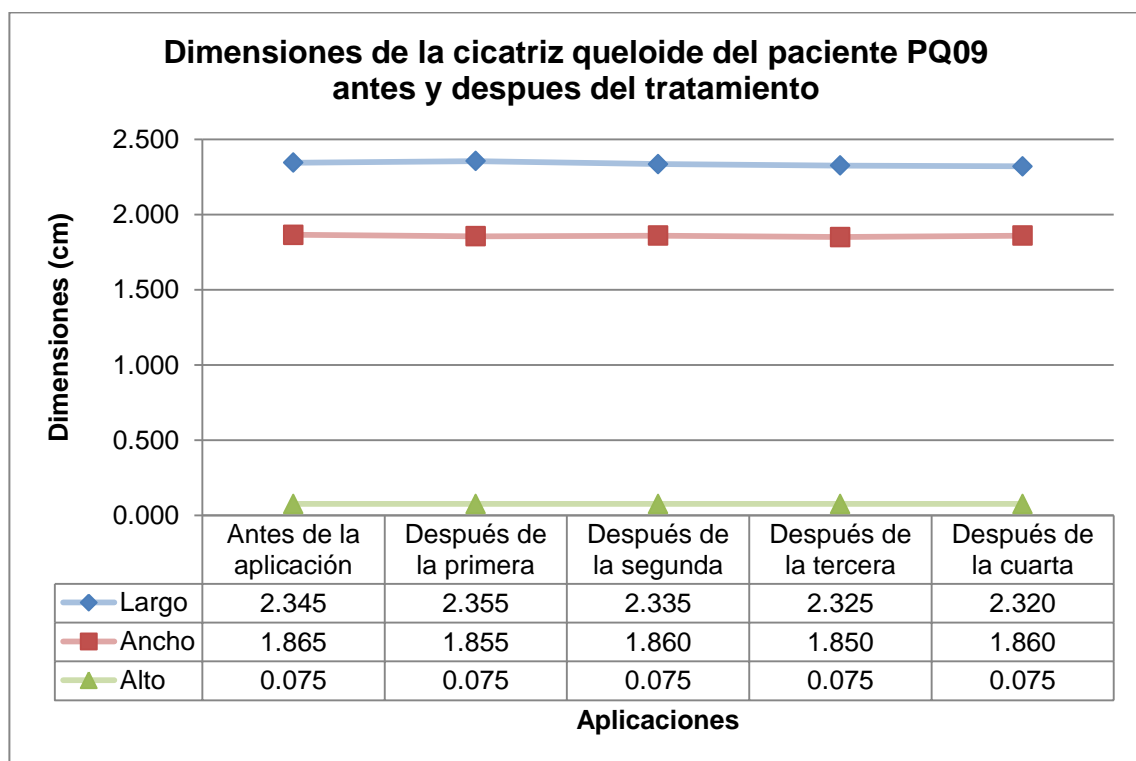
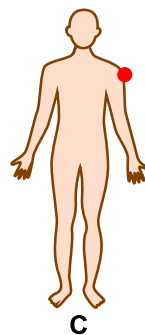


Figura N° 28. Dimensiones de la cicatriz queloide del paciente PQ09 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína.



- A:** Cicatriz queloide antes del tratamiento con la enzima papaína.
- B:** Cicatriz queloide después del tratamiento con la enzima papaína.
- C:** Localización de la cicatriz queloide.

Figura N° 29. Fotografías de la cicatriz queloide del paciente PQ09 antes y después del tratamiento y localización de la cicatriz.

Efectos secundarios descritos por el paciente: Ninguno.

La tabla N° 14 muestra los resultados de las mediciones de las dimensiones de la cicatriz queloide del paciente PQ09 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína liofilizada y en la figura 20 se graficaron dichas dimensiones. Al final del tratamiento se observa una disminución del largo de 2.345 a 2.320 y del ancho de 1.865 a 1.860, en el alto no hubo cambio en las dimensiones. Estos resultados evidencian la actividad proteolítica de la enzima papaína liofilizada en el caso del paciente PQ09.

- **Paciente PQ10**

Tabla N° 15. Resultados de las mediciones de la cicatriz tipo queoide del paciente PQ09 antes y después de las aplicaciones de Contractubex®.

PARAMETRO	APLICACIÓN EN QUE SE MIDIÓ LA CICATRIZ QUELOIDE					DELTA DE DISMINUCIÓN
	Antes	Después	Después	Después	Después	
	1°	1°	2°	3°	4°	
LARGO (cm)	5.135	5.130	5.140	4.950	5.115	0.020
ANCHO (cm)	1.260	1.260	1.240	1.240	1.255	0.005
ALTO (cm)	0.095	0.085	0.075	0.060	0.075	0.020

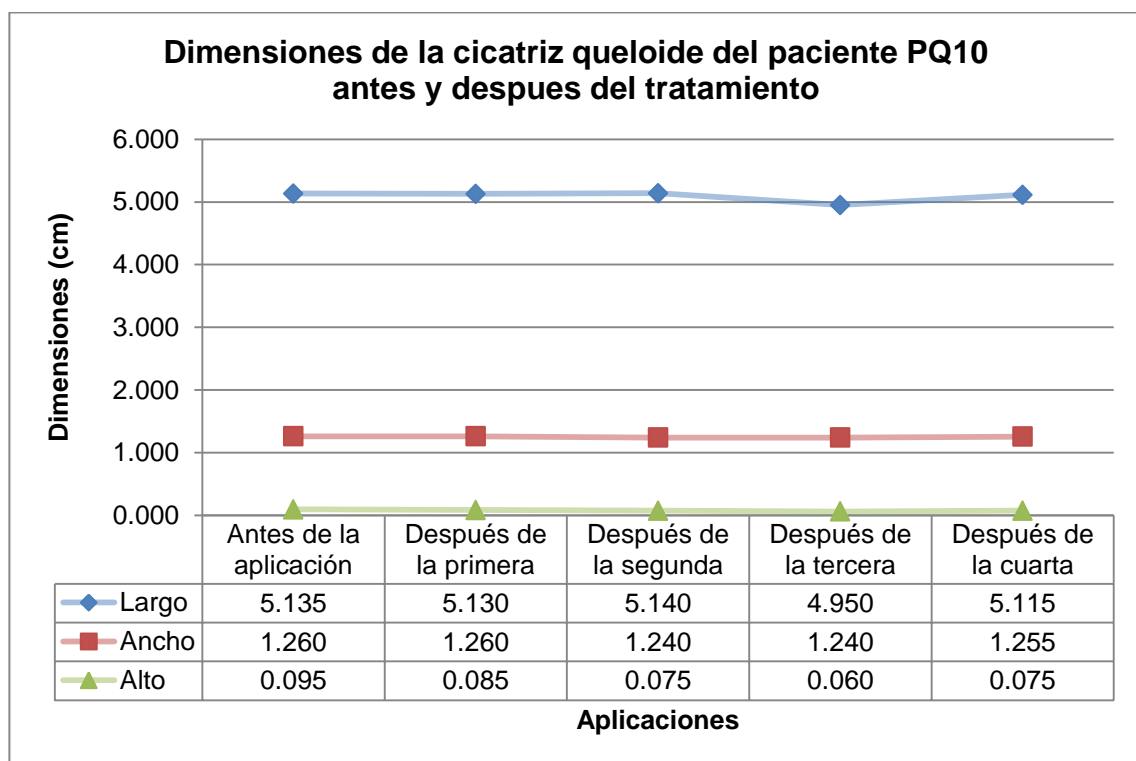
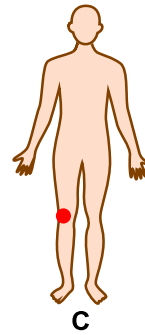


Figura N° 30. Dimensiones de la cicatriz queoide del paciente PQ10 antes y después de cada aplicación de Contractubex®.



- A:** Cicatriz queloide antes del tratamiento con la enzima papaína.
- B:** Cicatriz queloide después del tratamiento con la enzima papaína.
- C:** Localización de la cicatriz queloide.

Figura N° 31. Fotografías de la cicatriz queloide del paciente PQ10 antes y después del tratamiento y localización de la cicatriz.

Efectos secundarios descritos por el paciente: Ninguno.

La tabla N° 15 muestra los resultados de las mediciones de las dimensiones de la cicatriz queloide del paciente PQ10 antes y después de cada aplicación del medicamento Contractubex[®], y en la figura 22 se graficaron dichas dimensiones. Al final del tratamiento se observa una disminución del largo de 5.135 a 5.115, del ancho de 1.865 a 1.860 y del alto de 0.095 a 0.075. Estos resultados evidencian la actividad del medicamento Contractubex[®] en el caso del paciente PQ10.

5.5.2 Resumen de los resultados obtenidos luego de las aplicaciones de la enzima papaína en los pacientes.

Tabla N° 16. Tabla comparativa de los resultados de las mediciones de las cicatrices tipo queloide de los pacientes al inicio y al final del tratamiento.

CODIGO DE PACIENTE	DIMENSIONES DE LA CICATRIZ ANTES Y DESPUES DEL TRATAMIENTO		
	LARGO (cm)	ANCHO (cm)	ALTO (cm)
PQ01	Inicial: 5.250 Final: 5.135 $\Delta = 0.115$	Inicial: 1.305 Final: 1.255 $\Delta = 0.050$	Inicial: 0.200 Final: 0.205 $\Delta = - 0.005$
PQ02	Inicial:3.280 Final: 3.140 $\Delta = 0.140$	Inicial:1.280 Final:1.205 $\Delta = 0.075$	Inicial: 0.145 Final: 0.115 $\Delta = 0.030$
PQ03	Inicial:4.050 Final:4.030 $\Delta = 0.020$	Inicial:1.145 Final:1.125 $\Delta = 0.020$	Inicial: 0.050 Final: 0.035 $\Delta = 0.015$
PQ04	Inicial:4.075 Final:3.915 $\Delta = 0.160$	Inicial:0.625 Final: 0.530 $\Delta = 0.095$	Inicial: 0.110 Final: 0.060 $\Delta = 0.050$
PQ05	Inicial:5.800 Final:5.500 $\Delta = 0.300$	Inicial: 1.700 Final: 1.100 $\Delta = 0.600$	Inicial: 0.300 Final: 0.200 $\Delta = 0.100$
PQ06	Inicial: 6.060 Final:6.000 $\Delta = 0.060$	Inicial: 1.280 Final: 1.215 $\Delta = 0.065$	Inicial: 0.075 Final: 0.060 $\Delta = 0.015$
PQ07	Inicial:10.815 Final:10.735 $\Delta = 0.080$	Inicial: 0.835 Final: 0.775 $\Delta = 0.060$	Inicial: 0.220 Final: 0.200 $\Delta = 0.020$
PQ08	Inicial:3.075 Final:2.955 $\Delta = 0.120$	Inicial: 0.725 Final: 0.695 $\Delta = 0.030$	Inicial: 0.135 Final: 0.120 $\Delta = 0.015$
PQ09	Inicial:2.345 Final:2.320 $\Delta = 0.025$	Inicial: 1.865 Final: 1.860 $\Delta = 0.005$	Inicial: 0.075 Final: 0.075 $\Delta = 0.000$
PQ10	Inicial:5.135 Final:5.115 $\Delta = 0.020$	Inicial: 1.260 Final: 1.255 $\Delta = 0.005$	Inicial: 0.095 Final: 0.075 $\Delta = 0.020$

NOTA: Los pacientes PQ01 a PQ09 fueron tratados con la enzima papaína y solamente el paciente PQ10 fue tratado con el medicamento Contractubex®.

La tabla N° 16 presenta los resultados de las mediciones de las cicatrices tipo queloide antes y después de las aplicaciones de la enzima papaína liofilizada en los pacientes, también muestra el delta (Δ) el cual se obtiene restando la dimensión inicial de la cicatriz menos la dimensión final y refleja la disminución que experimento la cicatriz al finalizar el tratamiento.

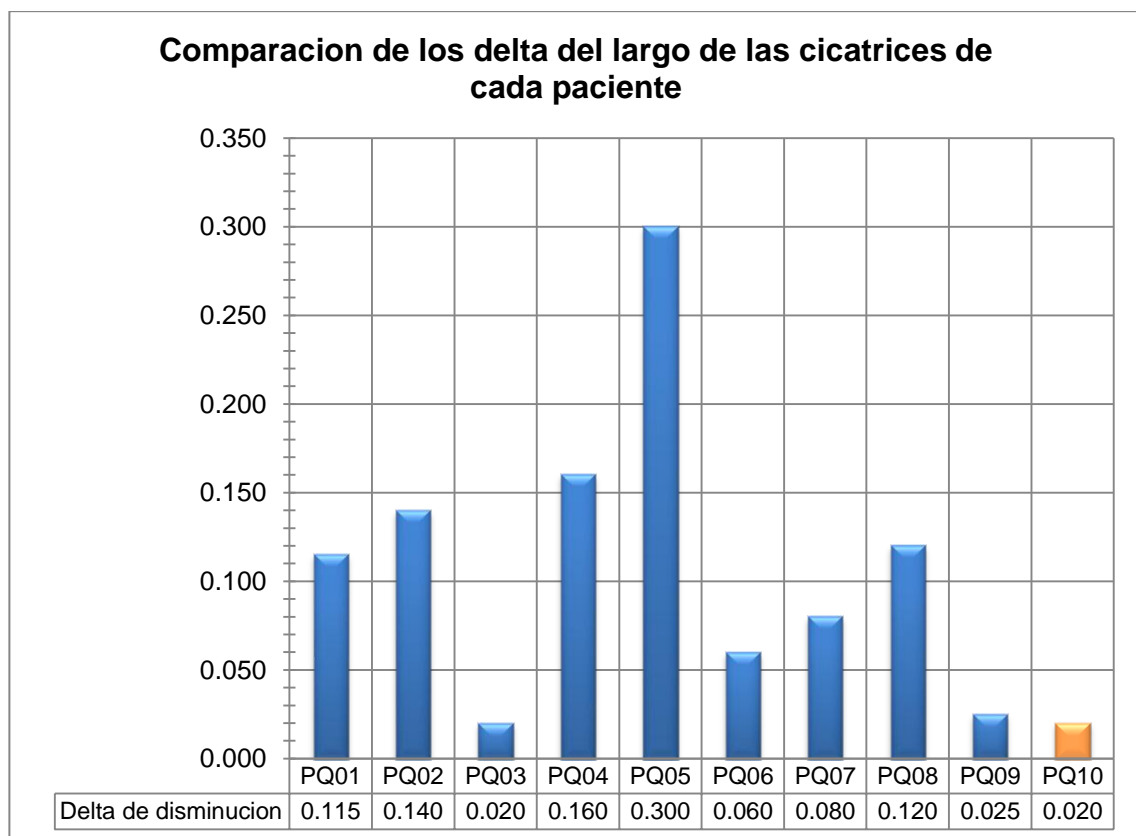


Figura N° 32. Comparación de los delta del largo de las cicatrices tipo queloide de cada uno de los pacientes tratados.

En la figura N° 32 se graficaron los deltas del largo de cada paciente resultantes al termino del tratamiento. Mediante este grafico se observa que el paciente PQ05 fue el caso donde se obtuvo una mayor disminución, con un delta de $\Delta = 0.300$, seguido de los pacientes PQ04 ($\Delta = 0.160$), PQ02 ($\Delta = 0.140$), PQ08 ($\Delta = 0.120$), PQ01 ($\Delta = 0.115$), PQ07 ($\Delta = 0.080$), PQ06 ($\Delta = 0.060$) y PQ09 ($\Delta =$

0.025). Es de destacar que en el caso del paciente PQ10 el cual fue tratado con el medicamento Contractubex[®], se encontró un delta de $\Delta = 0.020$ (con anaranjado en el grafico anterior), valor menor que los deltas del alto de los pacientes PQ05, PQ04, PQ02, PQ08, PQ01, PQ07, PQ06 y PQ09. Solamente el paciente PQ03 reporto un delta de igual valor que el del paciente PQ10 ($\Delta = 0.020$) y ninguno de los pacientes reporto un valor de delta menor al del paciente PQ10.

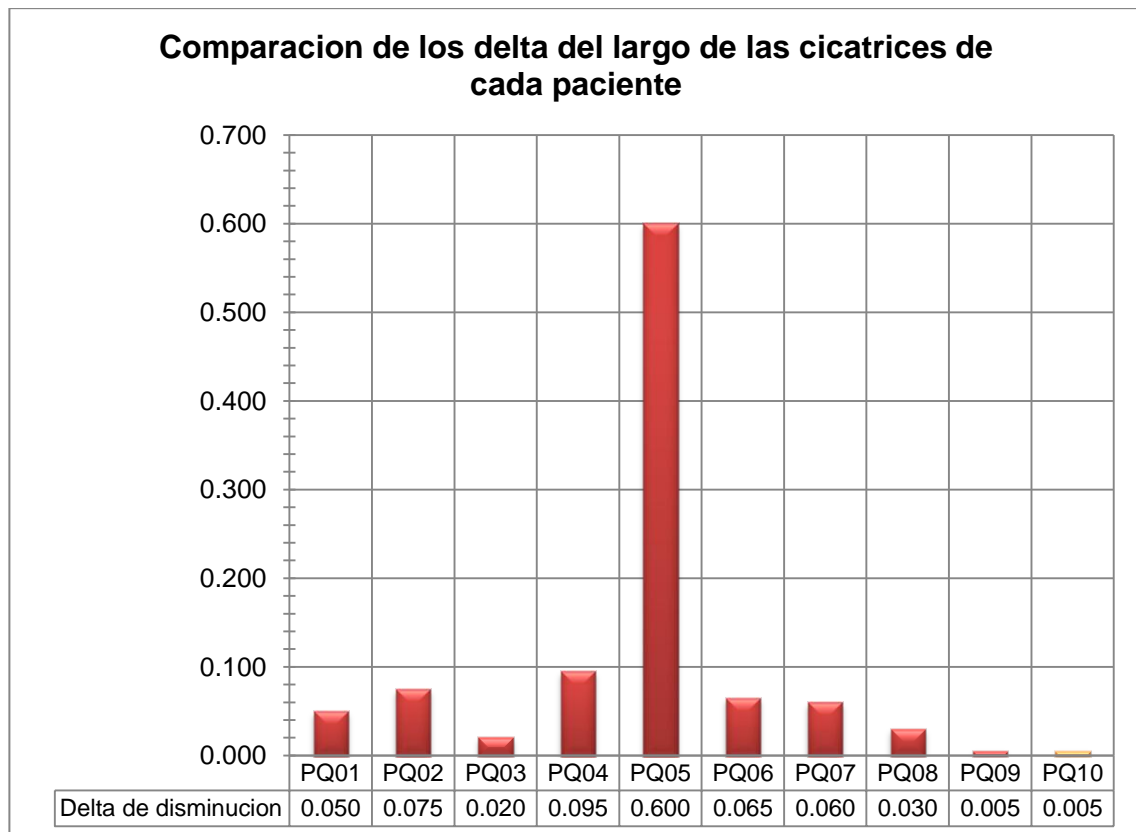


Figura N° 33. Comparación de los delta del ancho de las cicatrices tipo queoide de cada uno de los pacientes tratados.

En la figura N° 33 se graficaron los deltas del ancho de cada paciente resultantes al termino del tratamiento. Mediante este grafico se observa que el paciente PQ05 fue el caso donde se obtuvo una mayor disminución, con un

delta de $\Delta = 0.600$, seguido de los pacientes PQ04 ($\Delta = 0.095$), PQ02 ($\Delta = 0.075$), PQ06 ($\Delta = 0.065$), PQ07 ($\Delta = 0.060$), PQ01 ($\Delta = 0.050$), PQ08 ($\Delta = 0.030$) y PQ03 ($\Delta = 0.020$). Es de destacar que en el caso del paciente PQ10 el cual fue tratado con el medicamento Contractubex[®], se encontró un delta de $\Delta = 0.005$ (con anaranjado en el grafico anterior), valor menor que los deltas del ancho de los pacientes PQ05, PQ04, PQ02, PQ06, PQ07, PQ01, PQ08 y PQ03. Solamente el paciente PQ09 reporto un delta de igual valor que el del paciente PQ10 ($\Delta = 0.005$) y ninguno de los pacientes reporto un valor de delta menor al del paciente PQ10.

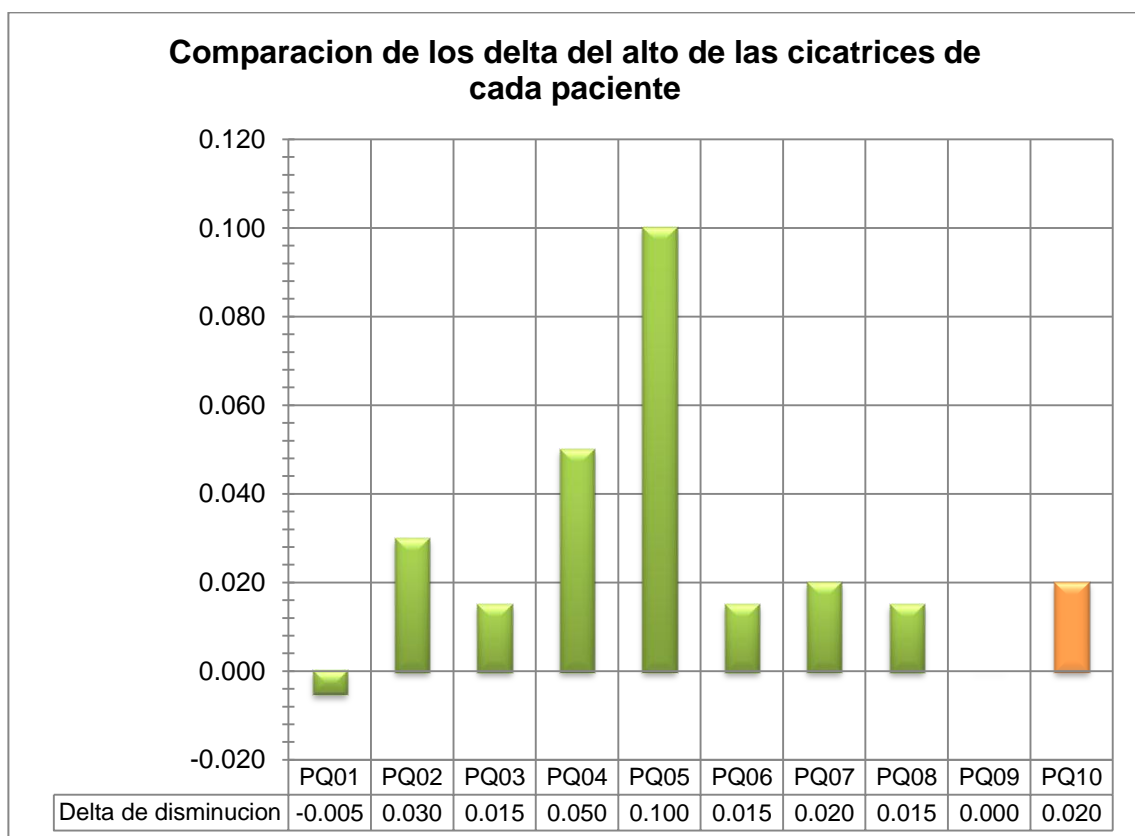


Figura N° 34. Comparación de los delta del alto de las cicatrices tipo queloide de cada uno de los pacientes tratados.

En la figura N° 34 se graficaron los deltas del alto de cada paciente resultantes al termino del tratamiento. Mediante este grafico se observa que el paciente PQ05 fue el caso donde se obtuvo una mayor disminuci3n, con un delta de $\Delta = 0.100$, seguido de los pacientes PQ04 ($\Delta = 0.050$) y PQ02 ($\Delta = 0.030$) Es de destacar que en el caso del paciente PQ10 el cual fue tratado con el medicamento Contractubex[®], se encontr3 un delta de $\Delta = 0.020$ (con anaranjado en el grafico anterior), valor menor que los deltas del alto de los pacientes PQ05, PQ04 y PQ02. Solamente el paciente PQ07 reporto un delta de igual valor que el del paciente PQ10 ($\Delta = 0.020$) y los pacientes PQ03 ($\Delta = 0.015$), PQ06 ($\Delta = 0.015$), PQ08 ($\Delta = 0.015$) y PQ09 ($\Delta = 0.000$), reportaron valores de delta menores al del paciente PQ10. El paciente PQ01 presento un cuadro atípico, pues el delta del alto resulto ser negativo ($\Delta = -0.005$), lo cual indicaría un aumento en las dimensiones, esto hace que este resultado se descarte y se atribuya a un error en la medici3n.

5.5.3 Inconvenientes encontrados en las mediciones de las cicatrices tipo queuloide.

El caso del paciente PQ01 con un delta negativo, pone de manifiesto los errores que conllevan las mediciones de las cicatrices tipo queuloide, la raz3n principal de estos errores radica en que los límites físicos de las cicatrices no siempre est3n bien definidos o delimitados, esto dificulta en gran manera la realizaci3n de una medici3n 3ptima puesto que no se tiene un punto de referencia totalmente certero desde y hasta el cual se debe realizar la medici3n, esto desde luego implica cierto grado de error extra en la medici3n. El inconveniente de la medici3n es solventado con las fotografías, en estas se puede apreciar sobre todo en el caso del paciente PQ01 zonas de prote3lisis luego de finalizar el tratamiento, así como tambi3n en el paciente PQ02 que presento una pequeña zona de prote3lisis luego de la cuarta aplicaci3n, en estos pacientes

se obtuvieron los más visibles resultados de la acción de la enzima sobre las cicatrices queloides. Igualmente valioso es el testimonio de cada paciente, puesto que ellos son quienes mejor están familiarizados con las características de la cicatriz, la mayoría de ellos manifestaron prurito en el área de aplicación, esto debido a los cambios en los tejidos de la cicatriz por la acción de la enzima, los pacientes PQ04 y PQ08 pudieron apreciar una decoloración de la cicatriz y el paciente PQ08 manifestó que las dimensiones de la cicatriz habían disminuido. El paciente PQ05 también observó una decoloración de la cicatriz y la desaparición de estrías circundantes de la cicatriz, manifestó además que antes de la aplicación el queloide le causaba dolor, y que estos habían desaparecido luego del tratamiento. El paciente PQ10 tratado con Contractubex® no manifestó ningún síntoma durante las aplicaciones del medicamento, tampoco ningún cambio en el color o dimensiones de la cicatriz.

En resumen, los resultados de las aplicaciones de la enzima papaína liofilizada a los pacientes con cicatrices tipo queloide sugieren una mayor actividad de la enzima papaína que la observada por el medicamento Contractubex®, durante el periodo de tratamiento, dicha actividad no se manifestó igual en todos los casos, obteniéndose los resultados más concluyentes en los casos de los pacientes PQ01, PQ02, PQ05 y PQ08, el tipo de piel así como la edad de la cicatriz, podrían ser las causas de las variaciones en los resultados obtenidos tras la aplicación de la enzima a cada paciente.

5.5.4 Resultados de la aplicación de la enzima papaína a los pacientes con verrugas.

A continuación se muestran las fotografías, tablas y gráficas con los resultados obtenidos de cada uno de los pacientes tratados con la enzima papaína y el paciente tratado con Callosil®.

- **Paciente PV01**

Tabla N° 17. Resultados de las mediciones de la verruga del paciente PV01 antes y después de las aplicaciones de la enzima papaína.

PARAMETRO	APLICACIÓN EN QUE SE MIDIÓ LA VERRUGA					DELTA DE DISMINUCIÓN
	Antes	Después	Después	Después	Después	
	1°	1°	2°	3°	4°	
LARGO (cm)	0.965	1.100	0.945	0.925	0.965	0.000
ANCHO (cm)	0.820	0.800	0.680	0.610	0.610	0.210
ALTO (cm)	0.205	0.220	0.280	0.250	0.190	0.015

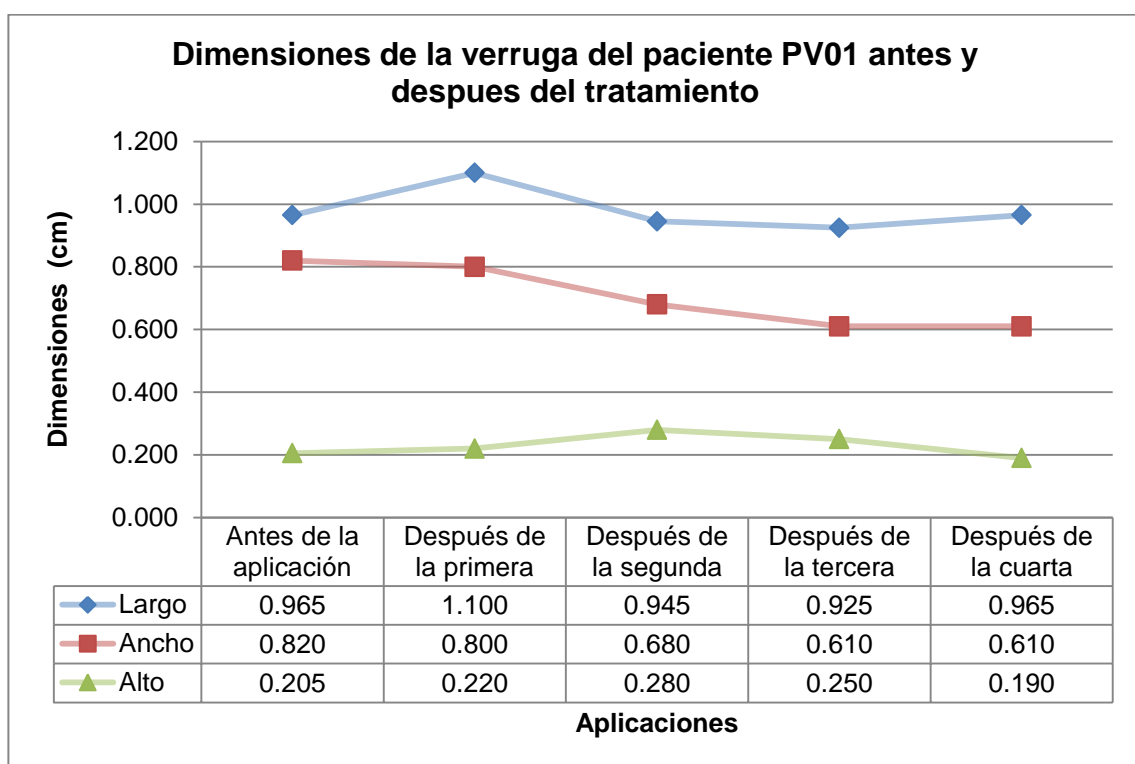
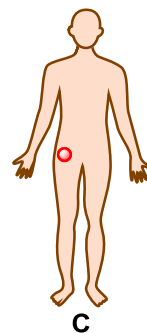


Figura N° 35. Dimensiones de la verruga del paciente PV01 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína.



- A:** Verruga antes del tratamiento con la enzima papaína.
- B:** Verruga después del tratamiento con la enzima papaína.
- C:** Localización de la verruga.

Figura N° 36. Fotografías de la verruga del paciente PV01 antes y después del tratamiento y localización de la verruga.

Efectos secundarios descritos por el paciente: El paciente manifestó intenso prurito sobre el área de aplicación.

La tabla N° 17 muestra los resultados de las mediciones de las dimensiones de la verruga del paciente PV01 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína liofilizada y en la figura 27 se graficaron dichas dimensiones. Al final del tratamiento se observa una disminución del ancho de 0.820 a 0.610 y del alto de 0.205 a 0.190, en el largo no hubo cambio en las dimensiones. Estos resultados evidencian la actividad proteolítica de la enzima papaína liofilizada en el caso del paciente PV01.

- **Paciente PV02**

Tabla N° 18. Resultados de las mediciones de la verruga del paciente PV02 antes y después de las aplicaciones de la enzima papaína.

PARAMETRO	APLICACIÓN EN QUE SE MIDIÓ LA VERRUGA					DELTA DE DISMINUCIÓN
	Antes	Después	Después	Después	Después	
	1°	1°	2°	3°	4°	
LARGO (cm)	0.760	0.715	0.760	0.710	0.650	0.110
ANCHO (cm)	0.660	0.595	0.680	0.610	0.510	0.150
ALTO (cm)	0.570	0.585	0.490	0.565	0.570	0.000

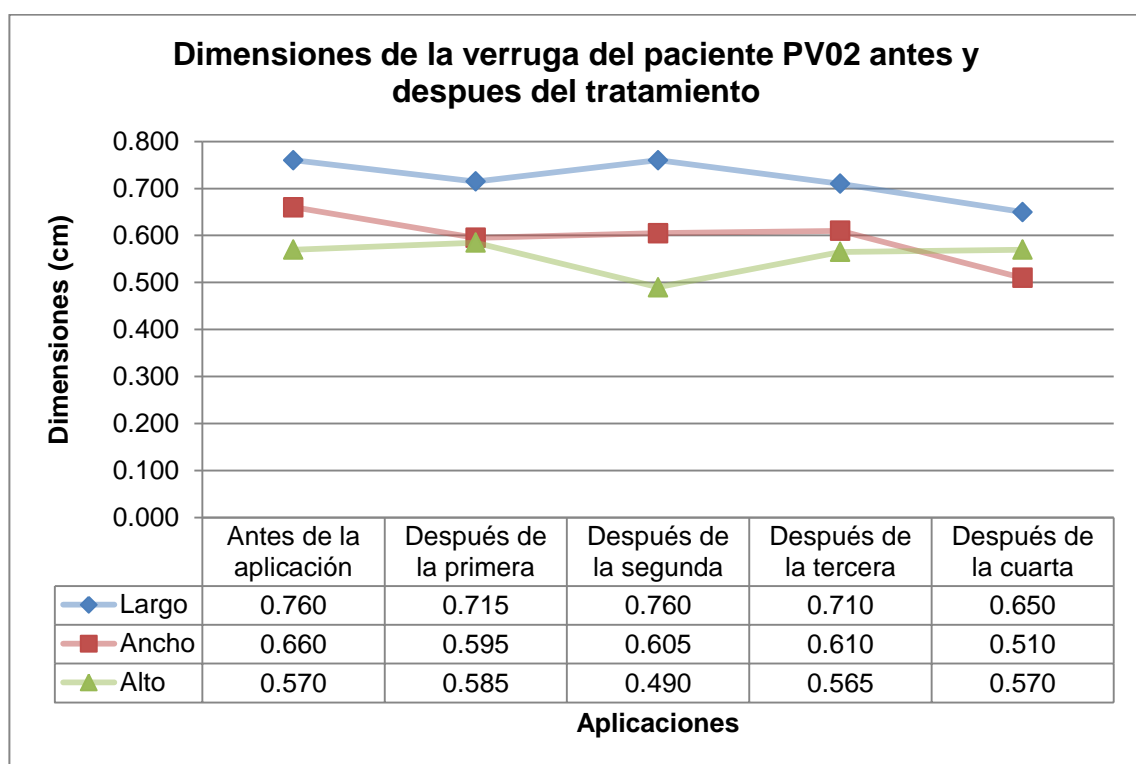
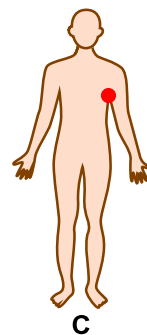


Figura N° 37. Dimensiones de la verruga del paciente PV02 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína.



- A:** Verruga antes del tratamiento con la enzima papaína.
- B:** Verruga despues del tratamiento con la enzima papaína.
- C:** Localización de la verruga.

Figura N° 38. Fotografías de la verruga del paciente PV02 antes y después del tratamiento y localización de la verruga.

Efectos secundarios descritos por el paciente: El paciente manifestó intenso prurito sobre el área de aplicación y ligera disminución de las dimensiones de la verruga.

La tabla N° 18 muestra los resultados de las mediciones de las dimensiones de la verruga del paciente PV02 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína liofilizada y en la figura 29 se graficaron dichas dimensiones. Al final del tratamiento se observa una disminución del largo de 0.760 a 0.650 y del ancho de 0.660 a 0.610, en el alto no hubo cambio en las dimensiones. Estos resultados evidencian la actividad proteolítica de la enzima papaína liofilizada en el caso del paciente PV02.

- **Paciente PV03**

Tabla N° 19. Resultados de las mediciones de la verruga del paciente PV03 antes y después de las aplicaciones de la enzima papaína.

PARAMETRO	APLICACIÓN EN QUE SE MIDIÓ LA VERRUGA					DELTA DE DISMINUCIÓN
	Antes	Después	Después	Después	Después	
	1°	1°	2°	3°	4°	
LARGO (cm)	0.395	0.365	0.375	0.340	0.350	0.045
ANCHO (cm)	0.400	0.430	0.440	0.380	0.400	0.000
ALTO (cm)	0.195	0.195	0.160	0.185	0.155	0.040

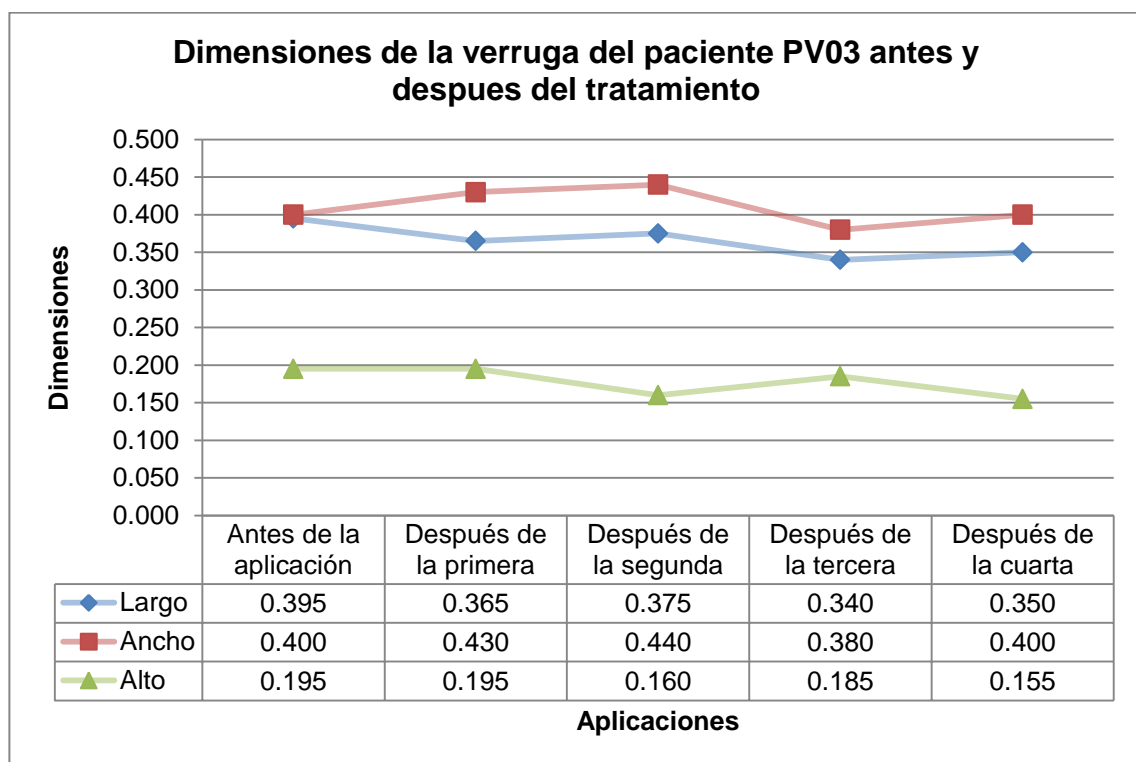
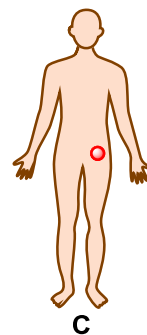


Figura N° 39. Dimensiones de la verruga del paciente PV03 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína.



- A:** Verruga antes del tratamiento con la enzima papaína.
- B:** Verruga despues del tratamiento con la enzima papaína.
- C:** Localización de la verruga.

Figura N° 40. Fotografías de la verruga del paciente PV03 antes y después del tratamiento y localización de la verruga.

Efectos secundarios descritos por el paciente: El paciente manifestó intenso prurito sobre el área de aplicación, decoloración y ligera disminución de las dimensiones de la verruga.

La tabla N° 19 muestra los resultados de las mediciones de las dimensiones de la verruga del paciente PV03 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína liofilizada y en la figura 31 se graficaron dichas dimensiones. Al final del tratamiento se observa una disminución del largo de 0.395 a 0.350 y del alto de 0.195 a 0.155, en el ancho no hubo cambio en las dimensiones. Estos resultados evidencian la actividad proteolítica de la enzima papaína liofilizada en el caso del paciente PV03.

- **Paciente PV04**

Tabla N° 20. Resultados de las mediciones de la verruga del paciente PV04 antes y después de las aplicaciones de la enzima papaína.

PARAMETRO	APLICACIÓN EN QUE SE MIDIÓ LA VERRUGA					DELTA DE DISMINUCIÓN
	Antes	Después	Después	Después	Después	
	1°	1°	2°	3°	4°	
LARGO (cm)	0.540	0.540	0.535	0.530	0.525	0.015
ANCHO (cm)	0.500	0.510	0.485	0.450	0.465	0.035
ALTO (cm)	0.115	0.100	0.110	0.095	0.085	0.030

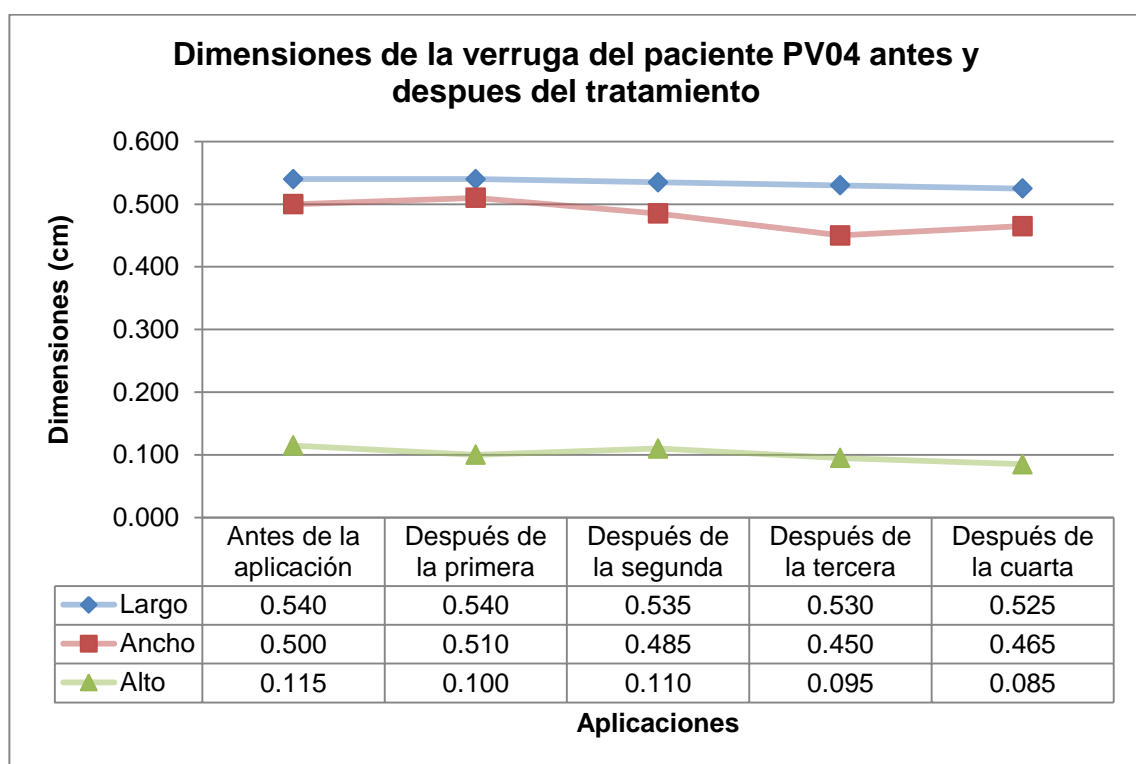
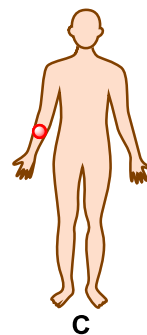


Figura N° 41. Dimensiones de la verruga del paciente PV04 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína.



- A:** Verruga antes del tratamiento con la enzima papaína.
- B:** Verruga despues del tratamiento con la enzima papaína.
- C:** Localización de la verruga.

Figura N° 42. Fotografías de la verruga del paciente PV04 antes y después del tratamiento y localización de la verruga.

Efectos secundarios descritos por el paciente: El paciente manifestó ablandamiento, decoloración y ligera disminución de las dimensiones de la verruga.

La tabla N° 20 muestra los resultados de las mediciones de las dimensiones de la verruga del paciente PV04 antes y después de cada aplicación de la enzima papaína liofilizada y en la figura 33 se graficaron dichas dimensiones. Al final del tratamiento se observa una disminución del largo de 0.540 a 0.525, del ancho de 0.500 a 0.465 y del alto de 0.115 a 0.085. Estos resultados evidencian la actividad proteolítica de la enzima papaína liofilizada en el caso del paciente PV04.

- **Paciente PV05**

Tabla N° 21. Resultados de las mediciones de la verruga del paciente PV05 antes y después de las aplicaciones del medicamento Callosil®.

PARAMETRO	APLICACIÓN EN QUE SE MIDIÓ LA VERRUGA					DELTA DE DISMINUCIÓN
	Antes	Después	Después	Después	Después	
	1°	1°	2°	3°	4°	
LARGO (cm)	0.400	0.380	0.300	0.345	0.325	0.075
ANCHO (cm)	0.400	0.310	0.300	0.330	0.310	0.090
ALTO (cm)	0.150	0.110	0.095	0.115	0.095	0.055

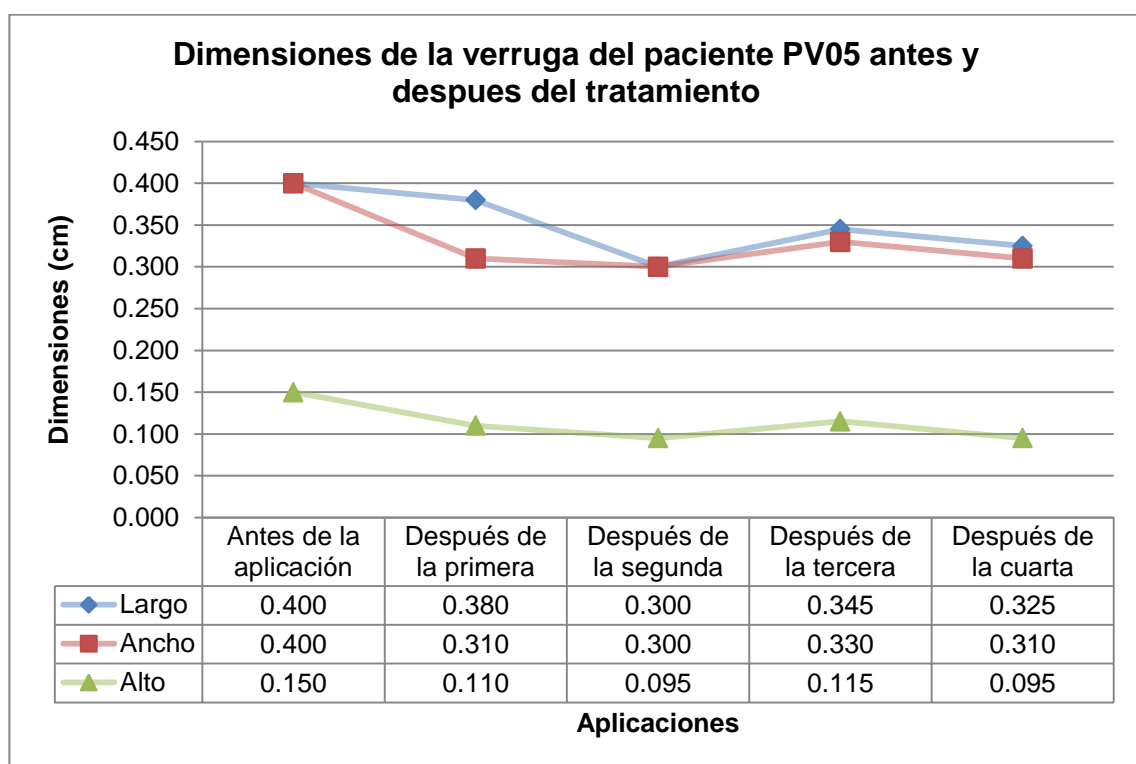
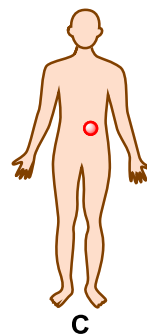


Figura N° 43. Dimensiones de la verruga del paciente PV05 antes y después de cada aplicación del medicamento Callosil®.



- A:** Verruga antes del tratamiento con la enzima papaína.
- B:** Verruga después del tratamiento con la enzima papaína.
- C:** Localización de la verruga.

Figura N° 44. Fotografías de la verruga del paciente PV05 antes y después del tratamiento y localización de la verruga.

Efectos secundarios descritos por el paciente: Ninguno.

La tabla N° 21 muestra los resultados de las mediciones de las dimensiones de la cicatriz queloide del paciente PV05 antes y después de cada aplicación del medicamento Callosil[®], y en la figura 22 se graficaron dichas dimensiones. Al final del tratamiento se observa una disminución del largo de 0.400 a 0.325, del ancho de 0.400 a 0.310 y del alto de 0.150 a 0.095. Estos resultados evidencian la actividad del medicamento Callosil[®] en el caso del paciente PV05.

5.5.5 Resumen de los resultados obtenidos luego de las aplicaciones de la enzima papaína en los pacientes.

Tabla N° 22. Tabla comparativa de las dimensiones de las verrugas de los pacientes al inicio y al final del tratamiento

CODIGO DE PACIENTE	DIMENSIONES DE LA VERRUGA ANTES Y DESPUES DEL TRATAMIENTO		
	LARGO (cm)	ANCHO (cm)	ALTO (cm)
PV01	Inicial:0.965 Final:0.965 $\Delta = 0.000$	Inicial: 0.820 Final: 0.610 $\Delta = 0.210$	Inicial: 0.205 Final: 0.190 $\Delta = 0.015$
PV02	Inicial:0.760 Final:0.650 $\Delta = 0.110$	Inicial: 0.660 Final: 0.510 $\Delta = 0.150$	Inicial: 0.570 Final: 0.570 $\Delta = 0.000$
PV03	Inicial:0.395 Final:0.350 $\Delta = 0.045$	Inicial: 0.400 Final: 0.400 $\Delta = 0.000$	Inicial: 0.195 Final: 0.155 $\Delta = 0.040$
PV04	Inicial:0.540 Final:0.525 $\Delta = 0.015$	Inicial: 0.500 Final: 0.465 $\Delta = 0.035$	Inicial: 0.115 Final: 0.085 $\Delta = 0.030$
PV05	Inicial:0.400 Final:0.325 $\Delta = 0.075$	Inicial: 0.400 Final: 0.310 $\Delta = 0.090$	Inicial: 0.150 Final: 0.095 $\Delta = 0.055$

NOTA: Los pacientes PV01 a PV04 fueron tratados con la enzima papaína y solamente el paciente PV05 fue tratado con el medicamento Callosil®.

La tabla N° 22 presenta los resultados de las mediciones de las verrugas antes y después de las aplicaciones de la enzima papaína liofilizada en los pacientes, también muestra el delta (Δ) el cual se obtiene restando la dimensión inicial de la cicatriz menos la dimensión final y refleja la disminución que experimento la cicatriz al finalizar el tratamiento.

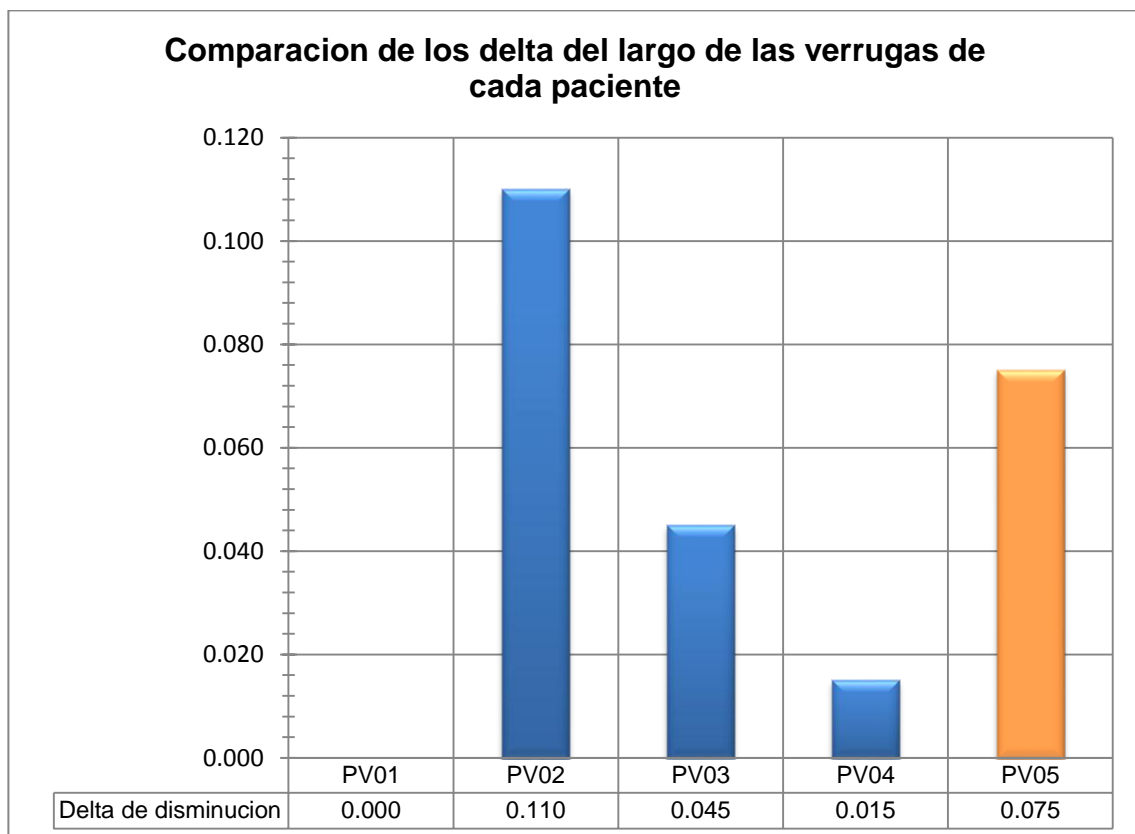


Figura N° 45. Comparación de los deltas del largo de las verrugas de cada uno de los pacientes tratados.

En la figura N° 45 se graficaron los deltas del largo de cada paciente resultantes al termino del tratamiento. Mediante este grafico se observa que el paciente PV02 fue el caso donde se obtuvo una mayor disminución, con un delta de $\Delta = 0.110$. Es de destacar que en el caso del paciente PV05 el cual fue tratado con el medicamento Callosil[®], se encontró un delta de $\Delta = 0.075$ (con anaranjado en el grafico anterior), valor mayor que los deltas del alto de los pacientes PV03 ($\Delta = 0.045$), PV04 ($\Delta = 0.015$) y PV01 ($\Delta = 0.000$).

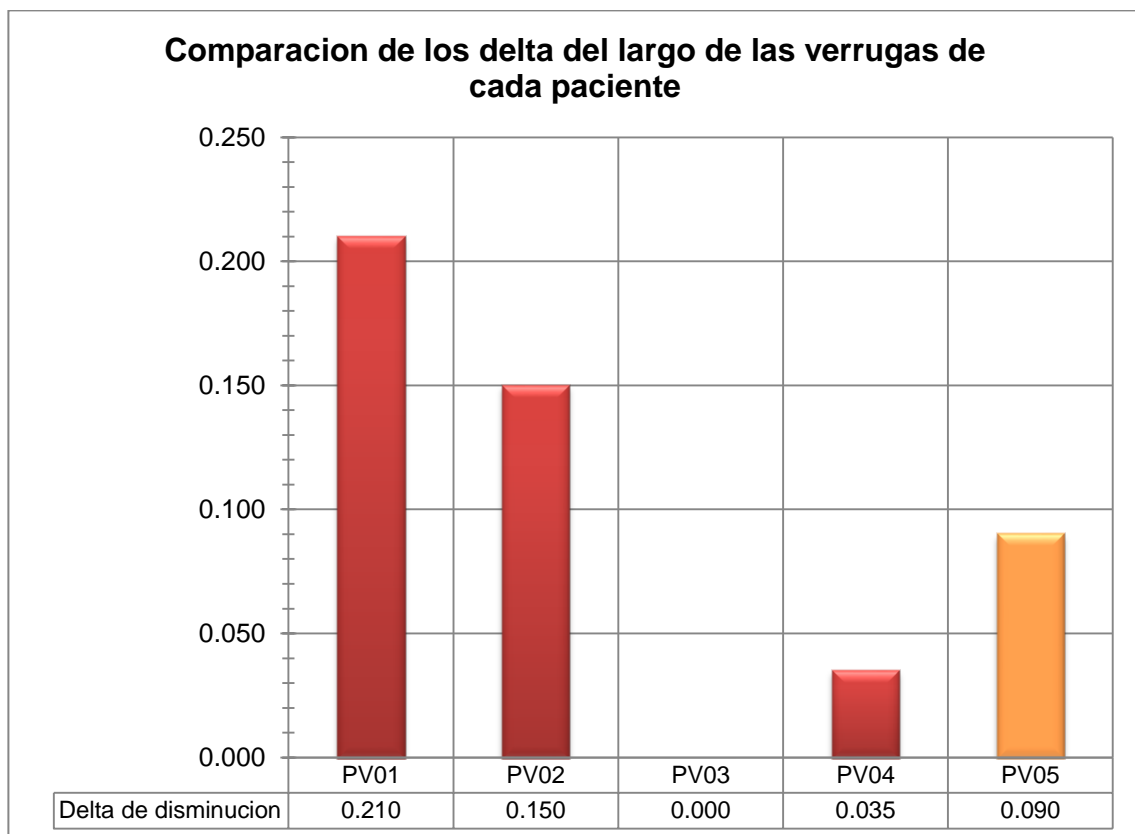


Figura N° 46. Comparación de los deltas del ancho de las verrugas de cada uno de los pacientes tratados.

En la figura N° 46 se graficaron los deltas del ancho de cada paciente resultantes al termino del tratamiento. Mediante este grafico se observa que el paciente PV01 fue el caso donde se obtuvo una mayor disminuci3n, con un delta de $\Delta = 0.210$, seguido del paciente PV02 ($\Delta = 0.150$). Es de destacar que en el caso del paciente PV05 el cual fue tratado con el medicamento Callosil[®], se encontr3 un delta de $\Delta = 0.090$ (con anaranjado en el grafico anterior), valor mayor que los deltas del ancho de los pacientes PV04 ($\Delta = 0.035$) y PV03 ($\Delta = 0.000$).

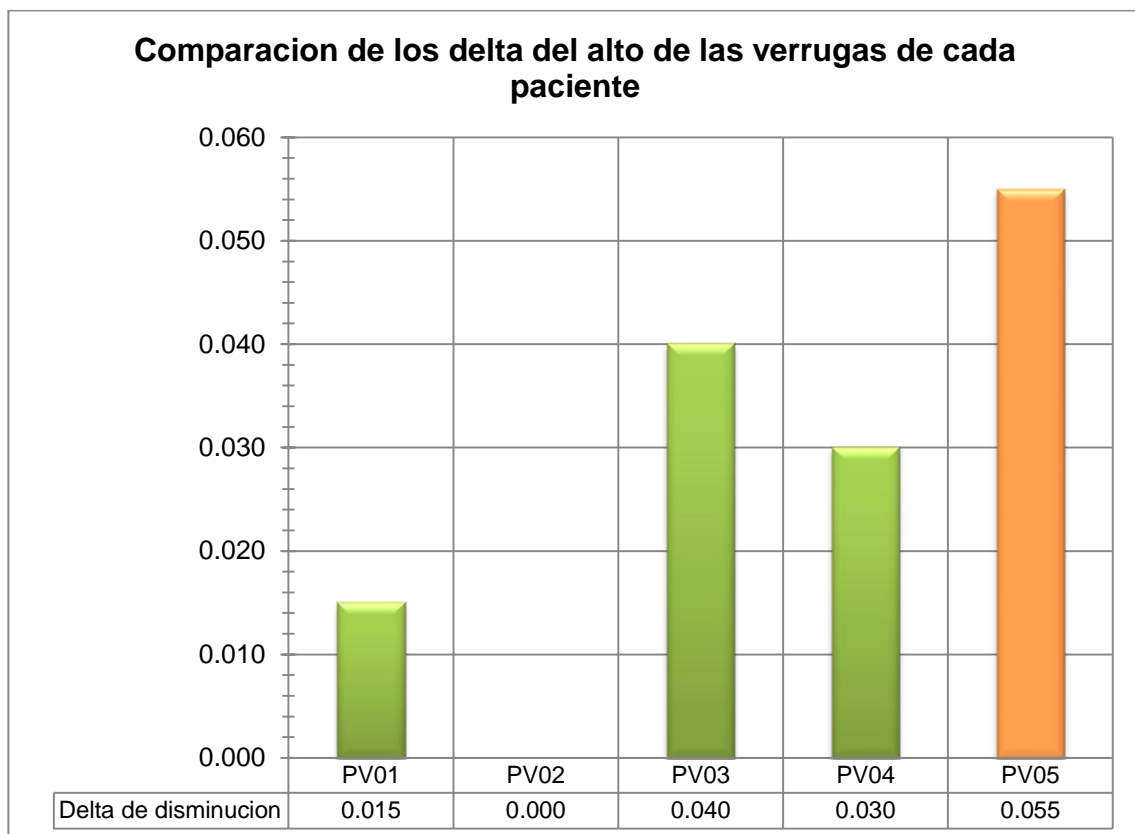


Figura N° 47. Comparación de los deltas del alto de las verrugas de cada uno de los pacientes tratados.

En la figura N° 47 se graficaron los deltas del alto de cada paciente resultantes al termino del tratamiento. Mediante este grafico se observa que el paciente PV05 el cual fue tratado con el medicamento Callosil[®], fue el caso donde se obtuvo una mayor disminuci3n con un delta de $\Delta = 0.055$ (con anaranjado en el grafico anterior), seguido de los pacientes PV03 ($\Delta = 0.040$), PV04 ($\Delta = 0.030$) y PV01 ($\Delta = 0.000$).

5.5.6 Inconvenientes encontrados en las mediciones de las verrugas.

Es importante tener en cuenta los errores implicados en las mediciones que se realizaron, en este caso el inconveniente no son los l3mites f3sicos de las

verrugas, sino su flacidez. La flacidez y según su localización, la acción mecánica a la que se ve sometida, provocan un aparente cambio de forma en la verruga, lo cual provoca que se tengan variaciones importantes en las mediciones.

Por otra parte, los pacientes PV01, PV02, PV03 manifestaron prurito sobre el área de aplicación y los últimos dos también dijeron percibir una ligera disminución de las dimensiones de la verruga, esto al igual que algunos de los pacientes con queloides tratados con la enzima papaína, lo cual sugiere que esta ejerce el mismo tipo de actividad en estas afecciones. La mejor evidencia de esto fue la proporcionada por el paciente PV04, ya que en las fotografías se puede apreciar una decoloración manifestada tras las aplicaciones, en este caso el paciente también dijo haber notado disminución en las dimensiones y ablandamiento de la verruga. Por su parte el paciente PV05 tratado con el medicamento Callosil[®], no experimentó ningún cambio o síntoma durante el tratamiento, a pesar de haberse encontrado disminuciones en las dimensiones de la verruga.

En resumen, los resultados de las aplicaciones de la enzima papaína liofilizada a los pacientes con verrugas sugieren una actividad equiparable de la enzima papaína a la observada por el medicamento Callosil[®], durante el periodo de tratamiento, dicha actividad no se manifestó igual en todos los casos, obteniéndose el mejor resultado en el caso del paciente PV04, el tipo de verruga, así como la edad de esta, podrían ser las causas de las variaciones en los resultados obtenidos tras la aplicación de la enzima a cada paciente

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. Por el método modificado de Kunitz se determinó que la actividad proteolítica de la enzima papaína liofilizada presentó un 100% de actividad a pH 5.5 y a 42 °C de temperatura. La temperatura corporal promedio de 37°C y el pH ácido de la piel (4.85 a 5.0) fueron idóneas para un porcentaje de 85.59% de actividad proteolítica de la enzima papaína liofilizada.
2. Debido a que los recuentos de microorganismos aerobios y de mohos y levaduras fueron menores a los especificados por la USP 32, y a la ausencia de los microorganismos patógenos ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomonas aeruginosa***, ***Salmonella spp*** y ***Escherichia coli***, por lo que la enzima papaína liofilizada es apta para su aplicación en uso humano.
3. La actividad proteolítica de la enzima papaína sobre las cicatrices tipo queloide se comprobó mediante la disminución de los deltas de las mediciones del largo, ancho y alto de las cicatrices tipo queloide de los pacientes PQ01 al PQ09 al final del tratamiento, así también las observaciones y efectos secundarios descritos por los pacientes permiten afirmar que la enzima papaína liofilizada ejerce una notable actividad proteolítica al ser aplicada en cicatrices tipo queloide.
4. También se comprobó la actividad proteolítica de la enzima papaína mediante la disminución de los deltas de las mediciones del largo, ancho y alto de las verrugas de los pacientes PV01 al PV04 al finalizar el tratamiento y por las observaciones y efectos secundarios descritos por los pacientes, lo que permite afirmar que la enzima papaína liofilizada ejerce una notable actividad proteolítica al ser aplicada en verrugas.

5. De acuerdo a los resultado obtenidos, la actividad de la enzima papaína es mayor en el tratamiento de cicatrices tipo queuloide que en el de verrugas, debido a que se observaron en el caso de ciertos pacientes con cicatrices queuloide, zonas de proteólisis, las cuales dejaban en evidencia la actividad que ejercía la enzima.
6. La utilización de la enzima papaína liofilizada en el tratamiento de cicatrices tipo queuloide y verrugas es bastante segura porque en general fue bien tolerada y solo se observaron irritaciones locales de piel, el prurito manifestado por algunos pacientes durante el tratamiento fue una manifestación de la ruptura de enlaces peptídicos de las proteínas de la cicatriz tipo queuloide o verruga, causada por la actividad proteolítica de la enzima y no requirió en ninguno de los casos discontinuar el tratamiento.
7. La enzima papaína liofilizada presento una actividad superior a la observada por parte del medicamento ensayado y patentado en el tratamiento de cicatrices tipo queuloide, esto de acuerdo con los resultados obtenidos con los pacientes al final del tratamiento.
8. La enzima papaína liofilizada presento una actividad similar y equiparable a la del medicamento ensayado y patentado en el tratamiento de verrugas, de acuerdo con los resultados obtenidos con los pacientes al final del tratamiento

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Que se continúe con la investigación de enzima papaína siempre enfocada a su aplicación en el tratamiento de cicatrices queloides, verrugas u otros tipos de cicatrices y verrugas, con el objeto de recabar más información clínica y datos prácticos sobre la actividad y efectos secundarios que la enzima presenta.
2. Que la enzima liofilizada sea refrigerada lo más rápido y que se utilice a la brevedad posible, esto para que su actividad no se vea afectada por la temperatura durante el periodo de almacenamiento y que sea utilizada durante su periodo de vida útil.
3. En futuras investigaciones, se prolongue el periodo del tratamiento y se aumente el número de pacientes con el fin de obtener resultados más concluyentes.
4. Que se valide un método de aplicación de la enzima para facilitar y optimizar la aplicación.
5. Diseñar un método para medir las cicatrices y verrugas, puesto que en algunos casos resulta difícil medir los límites y sobre todo la altura de la afección con precisión y más difícil aun reproducir una buena medición, lo que da como resultado errores en las medidas que se aprecian como aumentos de tamaños de algunas dimensiones.
6. Realizar más estudios clínicos para conocer mejor los efectos secundarios que se puede presentar al aplicar la enzima papaína en humanos.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Afonso W O, Biasutti E A R, De Marco L M, Lopes D C F, Silva V D M, Silvestre M P C. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Departamento de Alimentos, Facultad de Farmacia, Universidad Federal de Minas Gerais. *Ars Pharm.* 2006. 47 (4): 425-435.
2. Aguirre E, Castillo P. Extracción y estudio comparativo de las enzimas proteolíticas del fruto toronche (*Carica stipulata*) y de la papaya (*Carica papaya*) y su aplicación en la industria alimenticia. Guayaquil, Ecuador. Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción Escuela Superior Politécnica del Litoral.
3. Archila Jiménez R W. Propuesta de un manual de procedimientos microbiológicos para pruebas de límites microbianos en productos farmacéuticos no estériles, Trabajo de graduación, Lic en Química y Farmacia. San Salvador, El Salvador. 2009.
4. Asociación de promotores comunales salvadoreños, APROCSAL. Cincuenta especies de la flora medicinal existente en El Salvador. El Salvador. 2002.
5. Berkow R, Bondy P K, Dilts P V, Drossman D A, Gordon D R, Fletcher A J. et al. El manual Merck de diagnóstico y terapéutica. 9^a ed. Barcelona, España. DOYMA LIBROS. 1994.
6. Bermúdez Molina F R, Lipe Sanabria R G. Estudio preliminar de la actividad proteolítica de la enzima papaína sobre cicatrices tipo queloide y estrías.

Trabajo de graduación Lic. en Química y Farmacia. San Salvador, El Salvador. Universidad de El Salvador. 2005.

7. Bishal Kumar Singh, Medicherla V. Jagannadham, Monu Pande, Vikash K. Dubey. Papain-like proteases: Applications of their inhibitors. African Journal of Biotechnology. 2007. 6 (9): 1077-1086.
8. Chaverri Álvarez A. Comparación de la actividad proteolítica de la papaína secada por diferentes métodos. Trabajo de graduación, Facultad de Ingeniería. Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 1983.
9. Chávez Crisonino P. Estudio de prefactibilidad para una planta de papaína refinada. Trabajo de graduación, Facultad de Ingeniería. El Salvador. Universidad Centroamericana José Simeón Cañas. 1981.
10. Cuadra Zelaya T E. Normalización de la enzima papaína inmovilizada por la técnica de atrapamiento en gel, Trabajo de graduación, Lic. en Química y Farmacia. San Salvador, El Salvador. Universidad de El Salvador. 2000.
11. Ecoaldea.com. Papaya (***Carica papaya*** L). Sisa J. [Consultado el 24 de julio de 2010]. Disponible en: <http://www.ecoaldea.com/plmd/papaya.htm>
12. Gacesa P. Tecnología de las enzimas. 1ª ed. Zaragoza, España. 1990.
13. García Flores V A, Roldan Cerna E D. Ensayo de la actividad de la enzima papaína inmovilizada y su aplicación en aguas residuales de la industria alimenticia. Trabajo de graduación. Lic. en Química y Farmacia. San Salvador, El Salvador. Universidad de El Salvador. 2005.

14. Infoagro.com. El cultivo de la papaya. [Consultado el 10 de julio de 2010].
Disponible en: http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tropicales/papaya.htm
15. Kornberg. Pasión por las enzimas. 1^a ed. Madrid, España. 1992.
16. Madrigal Sánchez L. Efecto de algunas variables sobre el rendimiento de la papaína cruda. Trabajo de graduación, Lic. en Tecnología de Alimentos. Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 1978.
17. Mejía Aguilar R B, Vega Ramos C X. Medición de la actividad proteolítica de la enzima papaína natural extraída del látex de papayo (***Carica papaya***) e inmovilizada en gel de agar. Trabajo de graduación, Lic. en Química y Farmacia. San Salvador, El Salvador. Universidad de El Salvador. 2010.
18. Merck E. Enzimas. 1^a ed. Alemania. 1992.
19. Ortiz Navarrete A. Estudio sobre la actividad proteolítica y secado del látex de la papaya (***Carica papaya***) en Costa Rica. Trabajo de graduación, Lic. en Tecnología de Alimentos. Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 1978.
20. Sarote Nitsawang. Purification of papain from ***Carica papaya*** latex: Aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation. Enzyme and Microbial Technology. 2006. 39 (5): 1103-1107.
21. RTCA 11.03.56:09. Productos farmacéuticos. Productos naturales medicinales para uso humano. Verificación de la calidad.

22. The United States convention, inc. 2009. The United States Pharmacopeia USP 32, The National Formulary NF 27. Washington D.C. 2009. Apartado <61>.

23. Tortora Gerard J. Principios de anatomía y fisiología. 9ª ed. México. 2002.

24. Wiseman A. Manual de biotecnología de los enzimas. 2ª ed. Zaragoza, España. 1991.

ANEXOS

ANEXO N° 1



Figura N° 48. Establecimiento donde fueron compradas las papayas.

ANEXO Nº 2
CARTA DE IDENTIFICACION DE MUESTRA BOTANICA



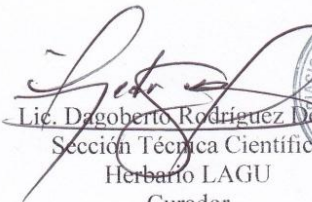
Antiguo Cuscatlán, Martes 7 de febrero de 2012


A quien interese:

Por medio de la presente se hace constar que los alumnos **Juan Carlos Mundo Zuna** y **Daniel Serrano Acosta**, ambos estudiantes de la carrera de Licenciatura en Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, se hicieron presentes a nuestro herbario solicitando la identificación de 1 muestra botánica conocida comúnmente como “papaya” la cual se conoce científicamente como *Carica papaya* L. y pertenece a la familia CARICACEAE.

Para el uso que los interesados estimen conveniente se les extiende presente nota

Atentamente.


Lic. Dagoberto Rodríguez Delcid
Sección Técnica Científica
Herbario LAGU
Curador



ANEXO Nº 3



Figura Nº 49. Extracción del látex de las papayas: **A.** Área de trabajo; **B.** Sanitización del área de trabajo; **C.** Sanitización de las papayas; **D.** Área de trabajo en condiciones asépticas; **E.** Realización de las incisiones; **F.** Recolección del látex.

ANEXO N° 4

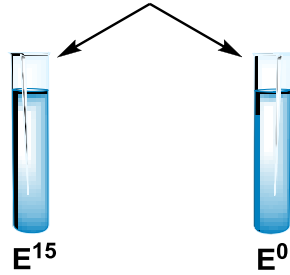


Figura N° 50. Liofilización del látex de las papayas: **A.** Látex recolectado en los tubos; **B.** Refrigerador donde se congelo el látex; **C.** Liofilizador Telstar Cryodos 6 con los tubos con látex; **D.** Retiro de los tubos al final de la liofilización; **E.** Recolección de la enzima liofilizada de los tubos; **F.** Viales con la enzima papaína liofilizada.

ANEXO Nº 5

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE LA ENZIMA
PAPAINA MEDIANTE EL METODO MODIFICADO DE KUNITZ.

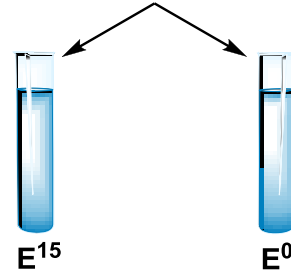
Agregar 1 mL de sustrato de Caseína ajustado a pH 9



Colocar los tubos E¹⁵ y E⁰ en baño de agua a 40 °C y dejar reposar 10 minutos



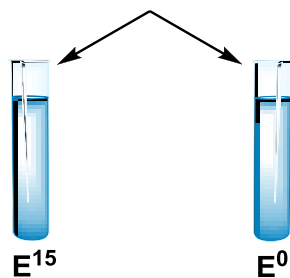
Agregar 1 mL de la solución de papaina



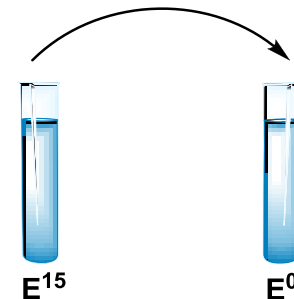
Incubar los tubos E¹⁵ y E⁰



Adicionar 3 mL de solución de ácido tricloro acético

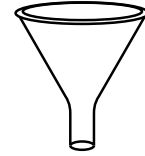


Adicionar el contenido del tubo E⁰ en E^{0'}





Colocar los tubos en baño de agua a 40° C por una hora para permitir la coagulación completa de la proteína precipitada



Filtrar con papel filtro Whatman 42



Leer las absorbancias de los filtrados a 280 nm.
Utilizar como blanco solución e ácido tricloroacético

Figura N° 51. Diagrama de procedimiento para la determinación de la actividad proteolítica de la enzima mediante el método modificado de Kunitz.

ANEXO Nº 6



Figura Nº 52. Determinación de la actividad proteolítica por el método modificado de Kunitz: **A.** Cristalería utilizada; **B.** Soluciones preparadas para la determinación; **C.** Baño de agua donde se incubaron los tubos; **D.** Preparación de los tubos E^0 , $E^{0'}$ y E^{15} ; **E y F.** Determinación de la absorbancia de los filtrados de E^{15} y $E^{0'}$.

ANEXO N° 7

CALCULOS PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA
PAPAINA LIOFILIZADA EN UNIDADES KUNITZ Y EN PORCENTAJE

CALCULO DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA PAPAINA LIOFILIZADA EN UNIDADES KUNITZ:

Formula:

$$\text{Actividad} = \frac{E^{15} - E^0}{C} \times 10^4$$

Dónde:

E^{15} : Es la Absorbancia después de 15 minutos de reacción

E^0 : Absorbancia inicial.

C: Es la concentración de la solución enzimática original en mg/mL

Ejemplo para la determinación de la actividad proteolítica en unidades Kunitz en función del pH (6.0) a temperatura constante de 40 °C:

Muestra 1

- Absorbancia inicial (E^0) = 0.020
- Absorbancia después de 15 minutos de reacción (E^{15}) = 0.751
- Concentración de la solución enzimática (C) = 0.308 mg/mL

$$\text{Actividad} = \frac{0.751 - 0.020}{0.308} \times 10^4 = 2.373 \times 10^4$$

Muestra 2

- Absorbancia inicial (E^0) = 0.008
- Absorbancia después de 15 minutos de reacción (E^{15}) = 0.671
- Concentración de la solución enzimática (C) = 0.308 mg/mL

$$\text{Actividad} = \frac{0.671 - 0.008}{0.308} \times 10^4 = 2.153 \times 10^4$$

Promedio de las dos muestras

$$\text{Actividad} = \frac{2.373 \times 10^4 + 2.153 \times 10^4}{2} = 2.263 \times 10^4$$

CALCULO DE ACTIVIDAD DE LA ENZIMA PAPAINA LIOFILIZADA EN PORCENTAJE:

Fórmula:

$$\text{Actividad relativa (\%)} = \frac{\text{Valor de actividad buscada en unidades Kunitz}}{\text{Valor de actividad maxima en unidades Kunitz}} \times 100 \%$$

Dónde:

Valor 100% de actividad relativa = Mayor valor de actividad observada en unidades Kunitz.

Ejemplo para la determinación de la actividad proteolítica en porcentaje en función del pH (6.0) a temperatura constante de 40 °C:

- Actividad buscada en unidades Kunitz (pH 6.0) = 2.263×10^4
- Actividad máxima en unidades Kunitz de la enzima papaína liofilizada a temperatura constante de 40 °C (pH 5.5) = 2.704×10^4

$$\text{Actividad relativa (\%)} = \frac{2.263 \times 10^4}{2.704 \times 10^4} \times 100 \% = 83.69 \%$$

ANEXO Nº 8

RECUESTO TOTAL DE MICROORGANISMOS AEROBIOS (MÉTODO EN PLACA)

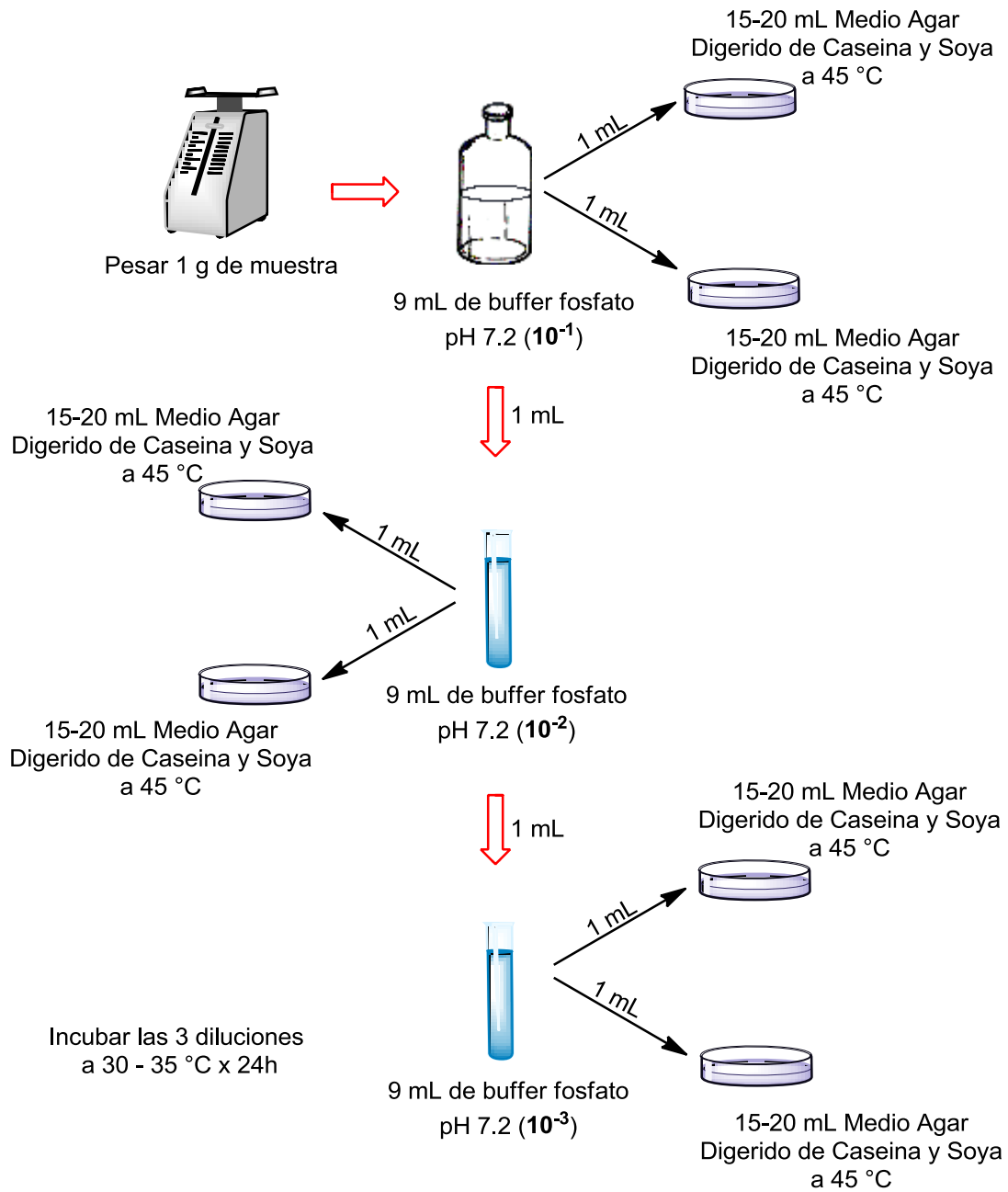


Figura Nº 53. Diagrama de procedimientos para el recuento total de microorganismos aerobios (Método en placa).

ANEXO N° 9

PLACAS CON MEDIO AGAR DIGERIDO DE CASEÍNA Y SOYA PARA EL RECUENTO TOTAL DE MICROORGANISMOS AEROBIOS

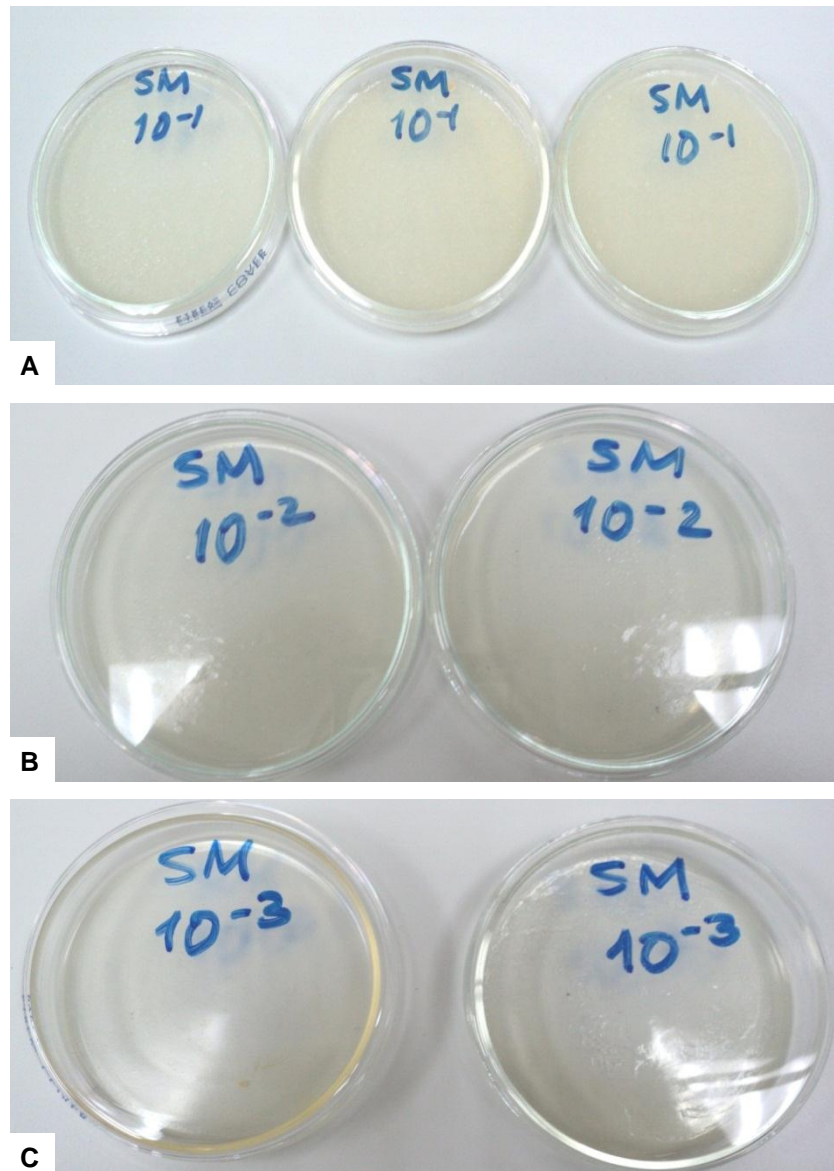


Figura N° 54. Placas con Medio Agar Digerido de Caseína y Soya para el recuento total de microorganismos aerobios: **A.** Placas con el Medio Agar Digerido de Caseína y Soya, dilución 10^{-1} ; **B.** Placas con el Medio Agar Digerido de Caseína y Soya, dilución 10^{-2} ; **C.** Placas con el Medio Agar Digerido de Caseína y Soya, dilución 10^{-3} .

ANEXO N° 10
DETERMINACIÓN DE AUSENCIA DE *Staphylococcus aureus*.

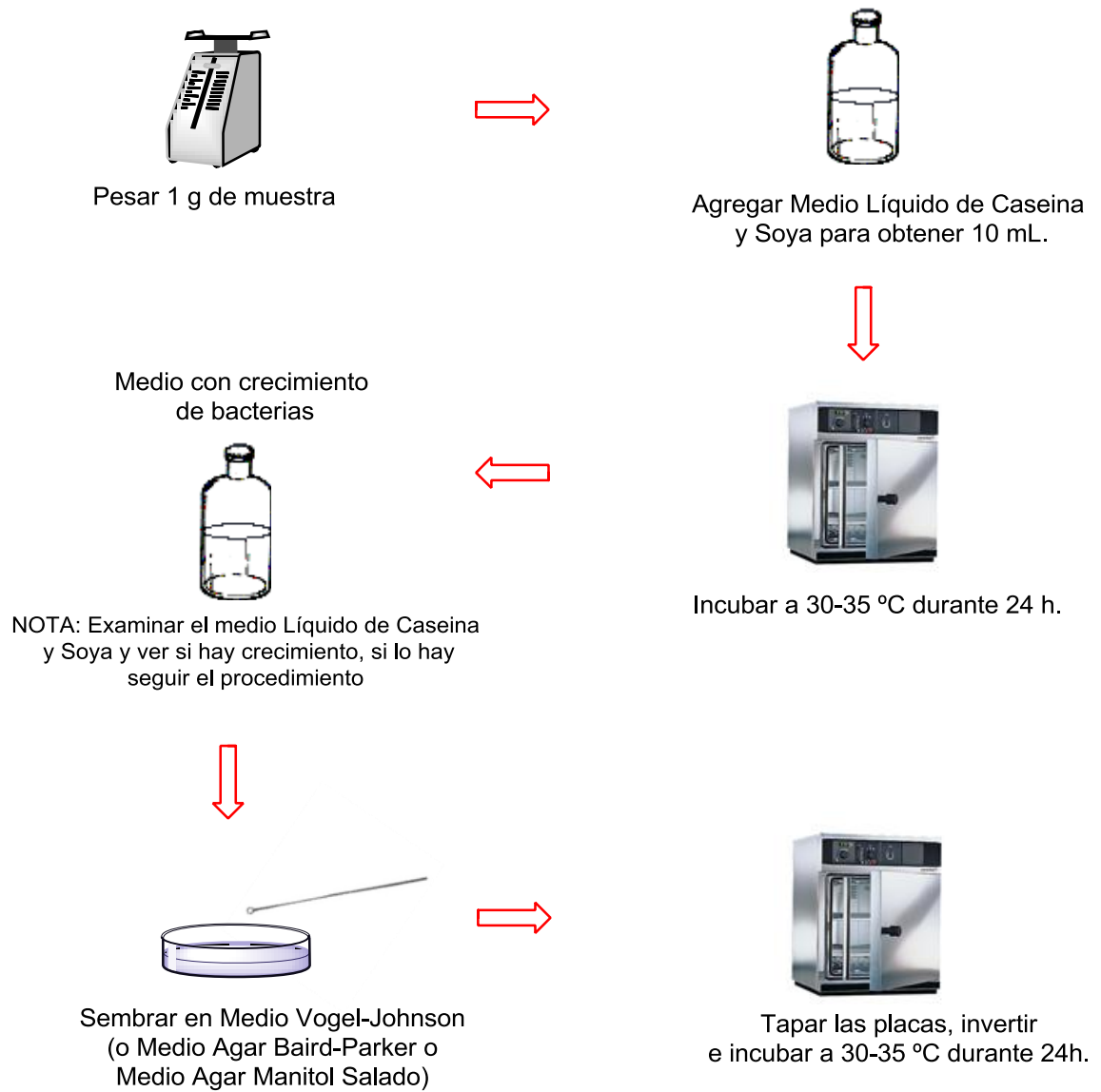
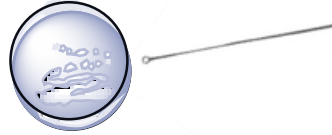


Figura N° 55. Diagrama de procedimientos para la determinación de ausencia de *Staphylococcus aureus*.



Transferir colonias sospechosas de la superficie del Medio Agar Vogel-Johnson(o Medio Agar Baird-Parker o Medio Agar Manitol Salado) a tubos con 0.5 mL de plasma



Tubos inoculados en 0.5 mL de plasma humano



Incubar en baño de Maria a 37 °C y examinar los tubos a las 3 h y subsecuentemente a intervalos regulares hasta las 24 h.

Figura N° 56. Diagrama de procedimientos para la realización de la prueba de la coagulasa.

ANEXO N° 11

PLACAS CON EL MEDIO AGAR BAIRD-PARKER PARA LA DETERMINACION DE AUSENCIA DE *Staphylococcus aureus*.

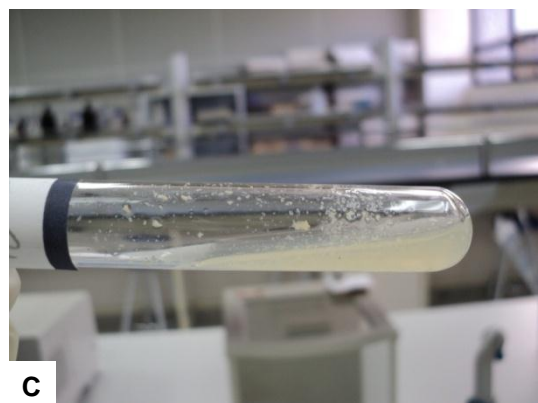
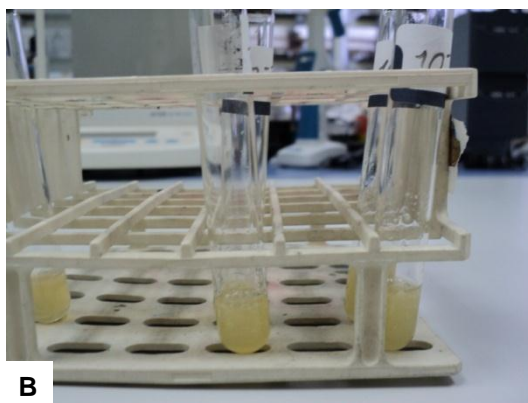
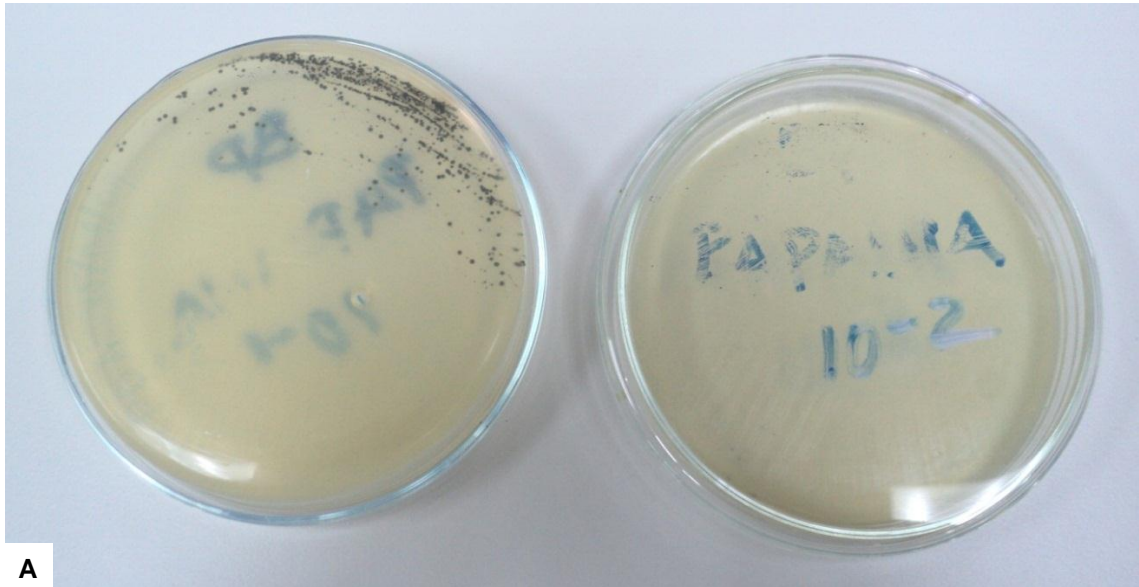


Figura N° 57. Determinación de ausencia de *Staphylococcus aureus*: **A.** Placas con el Medio Agar Baird-Parker; **B.** Tubos con plasma para la prueba de la coagulasa; **C.** Tubo con prueba de coagulasa, resultado negativo.

ANEXO N° 12

DETERMINACIÓN DE AUSENCIA DE *Pseudomonas aeruginosa*.

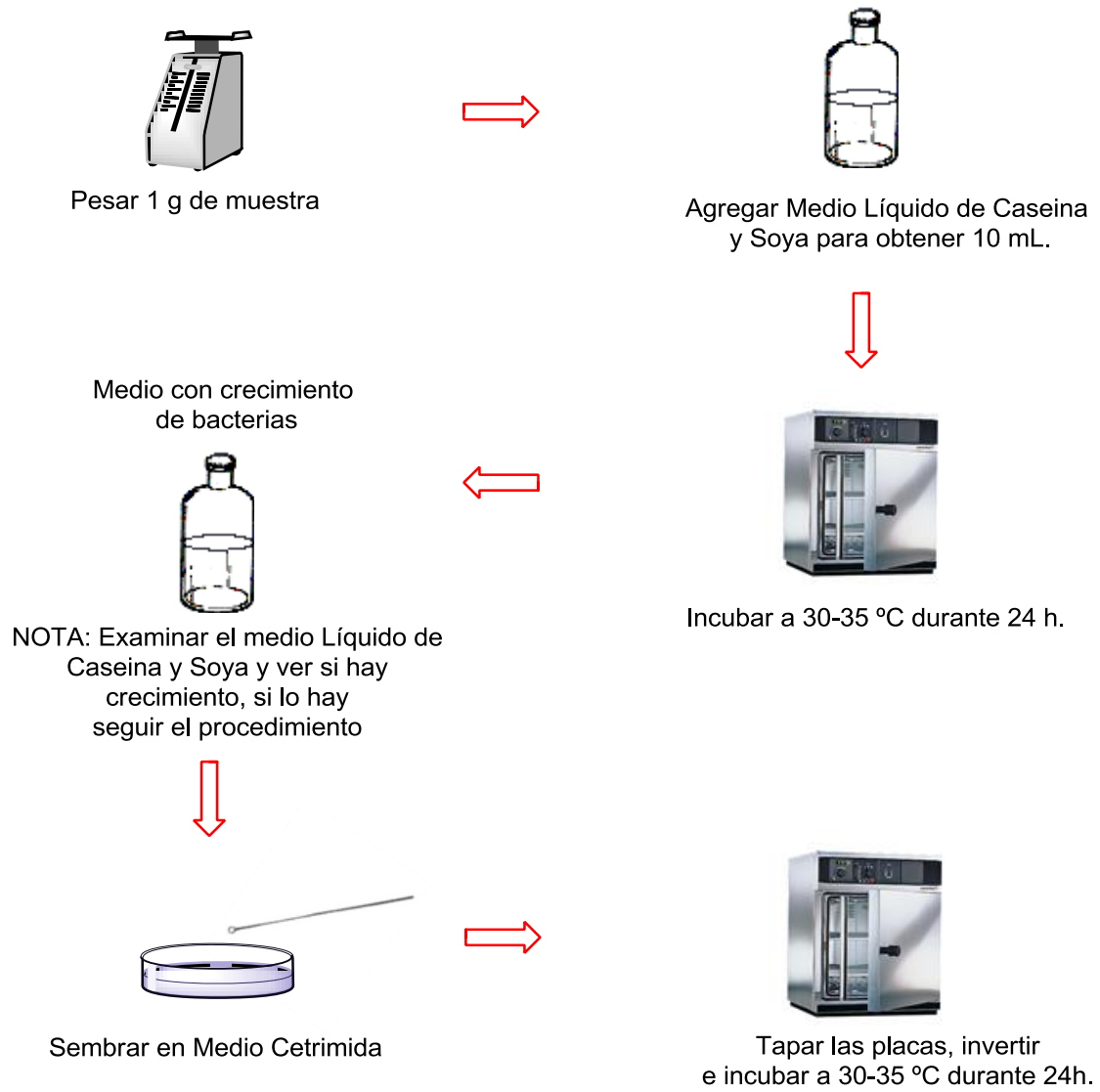


Figura N° 58. Diagrama de procedimientos para la determinación de ausencia de *Pseudomonas aeruginosa*.

ANEXO Nº 13

PLACAS CON EL MEDIO AGAR CETRIMIDA PARA LA DETERMINACION DE
AUSENCIA DE *Pseudomonas aeruginosa*.

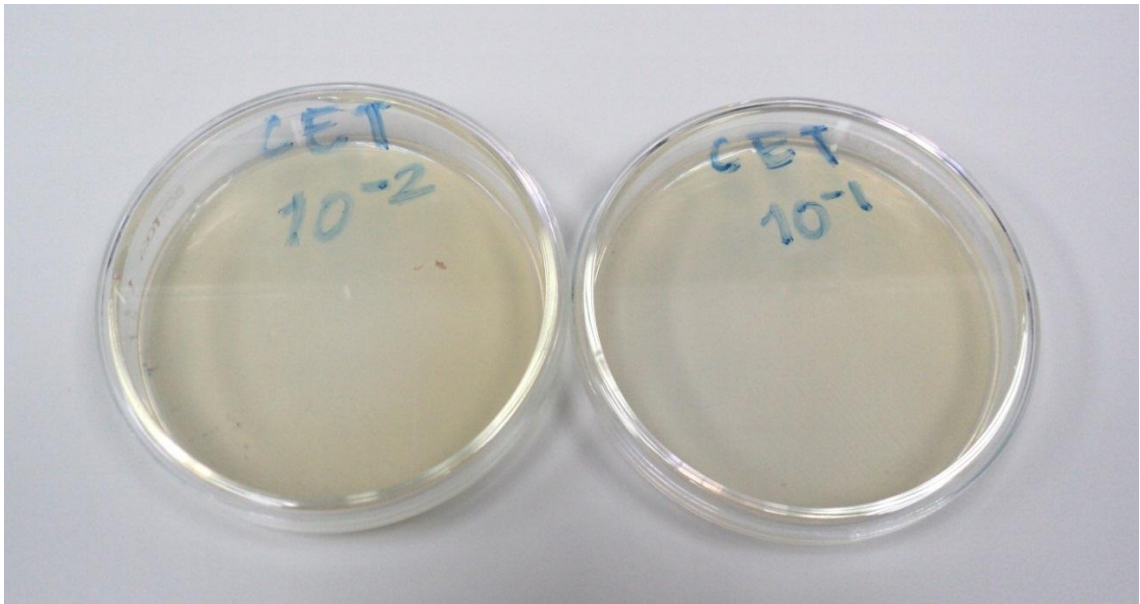


Figura Nº 59. Placas con Medio Agar Cetrinida.

ANEXO N° 14

DETERMINACIÓN DE AUSENCIA *Salmonella spp.*

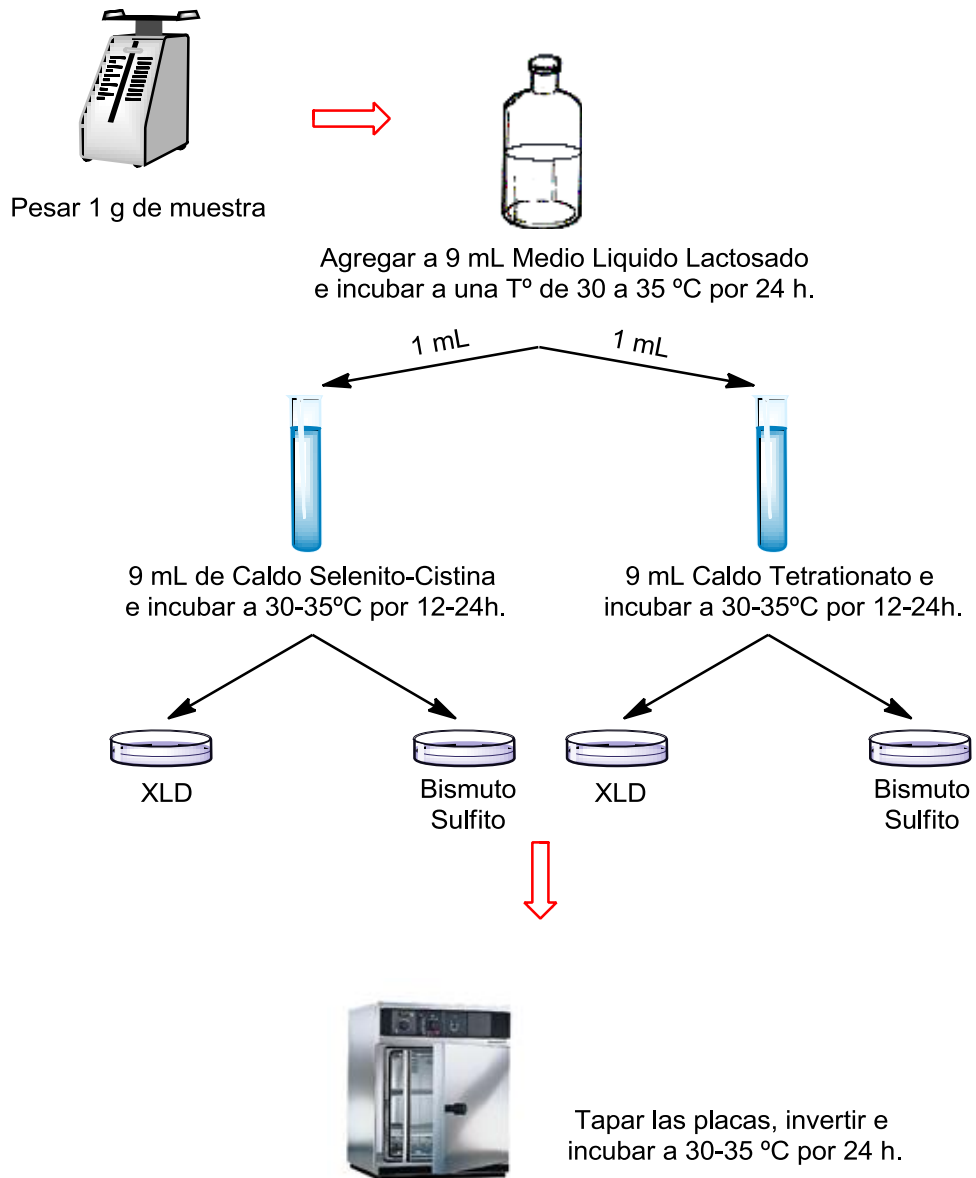


Figura N° 60. Diagrama de procedimientos para la determinación de ausencia de *Salmonella spp.*

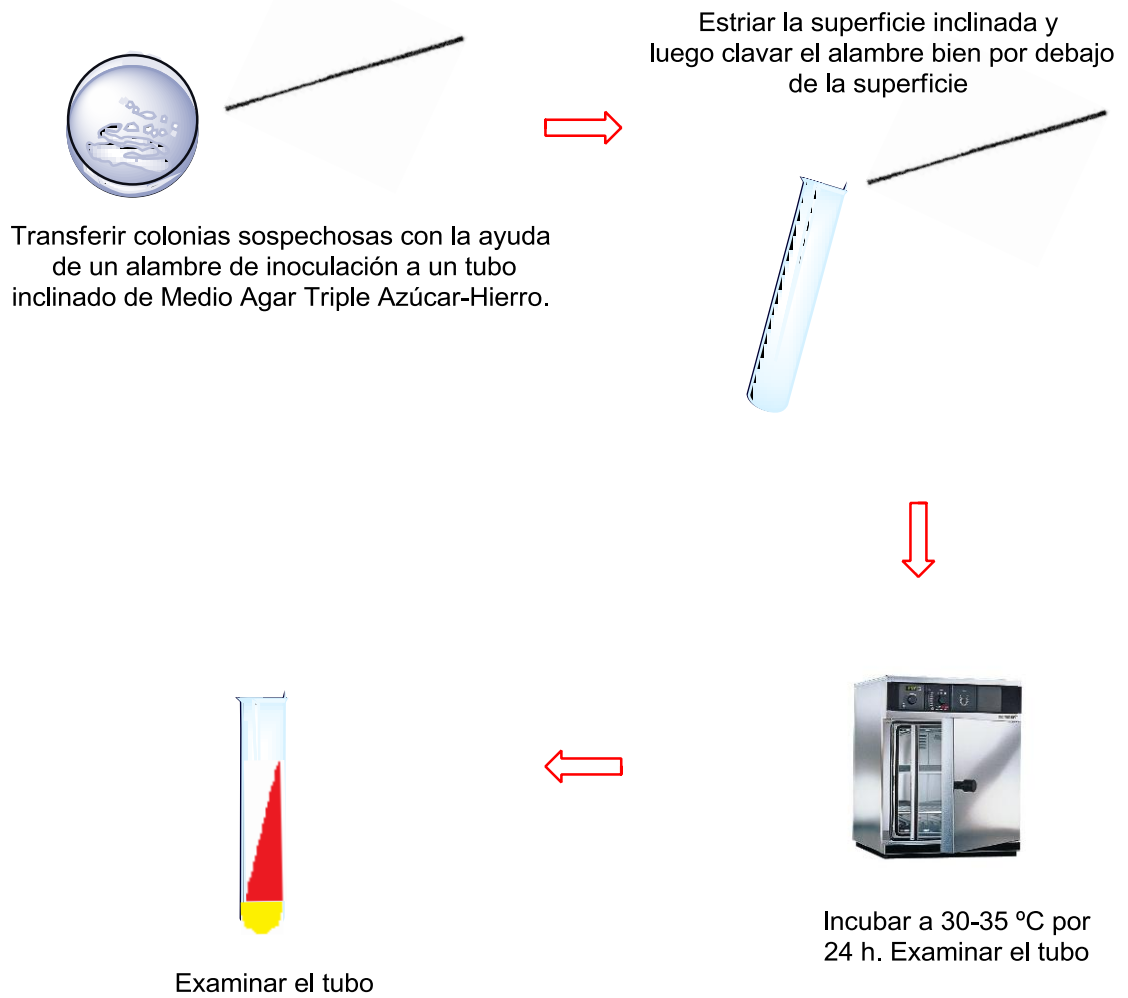


Figura N° 61. Diagrama de procedimientos para la realización de la prueba adicional en el Medio Agar - Triple Azúcar – Hierro.

ANEXO Nº 15

PLACAS CON EL MEDIO AGAR XLD Y CON EL MEDIO AGAR SULFITO DE BISMUTO PARA LA DETERMINACION DE AUSENCIA DE *Salmonella spp.*

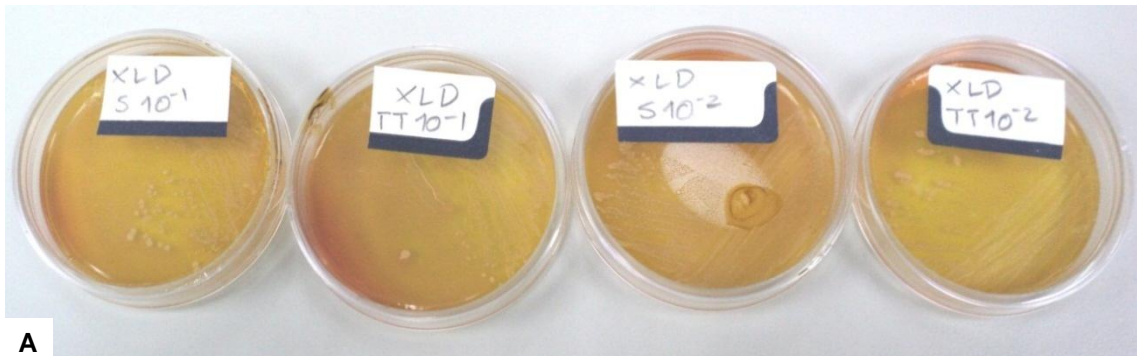


Figura Nº 62. Determinación de ausencia de *Salmonella spp.*: **A.** Placas con el Medio Agar XLD; **B.** Placas con el Medio Agar Sulfito de Bismuto.

ANEXO Nº 16

DETERMINACIÓN DE AUSENCIA DE *Escherichiacoli*.

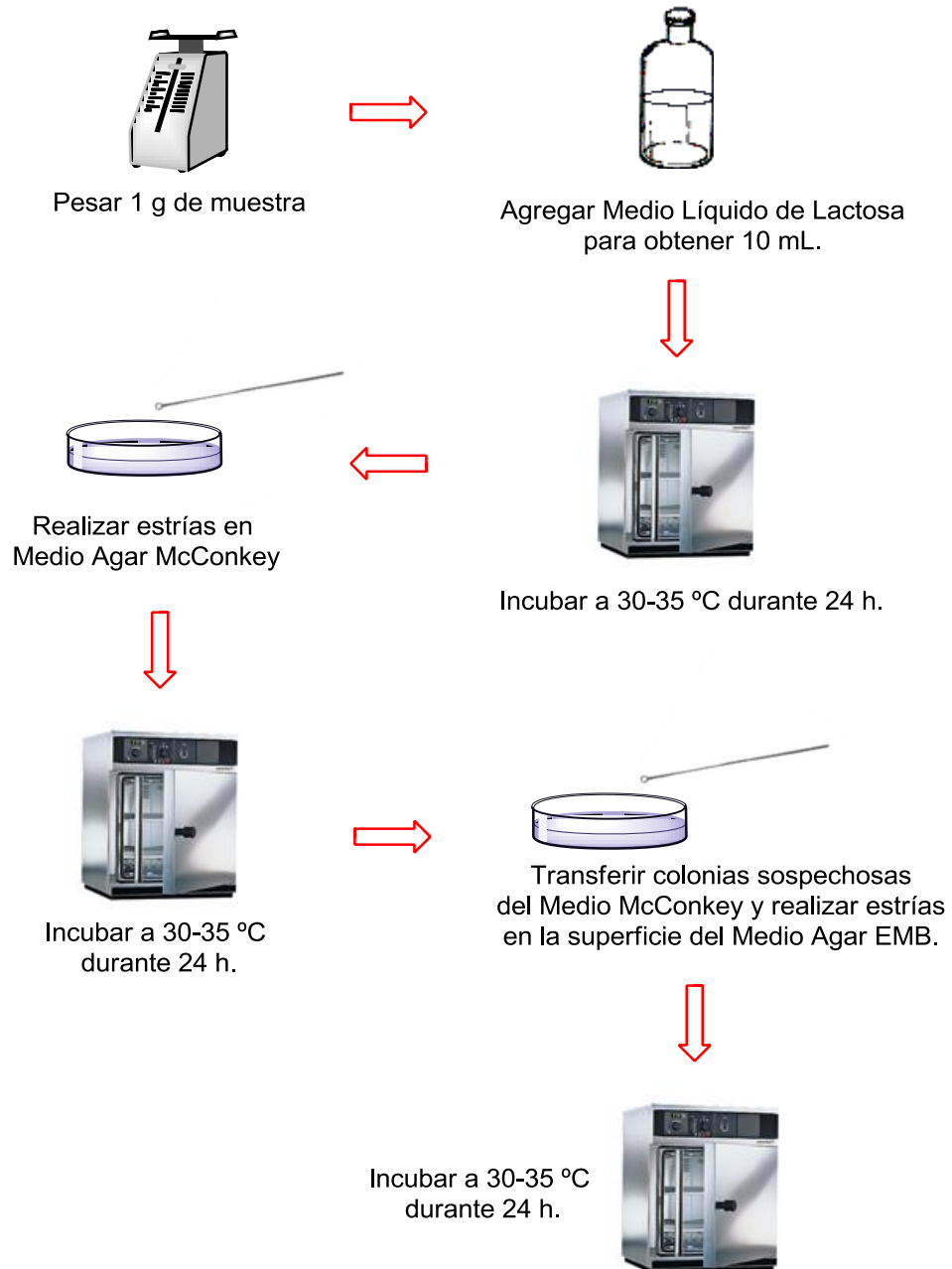


Figura 63. Diagrama de procedimientos para la determinación de ausencia de *Escherichia coli*.

ANEXO Nº 17

PLACAS CON EL MEDIO AGAR EMB PARA LA DETERMINACION DE
AUSENCIA DE *Escherichia coli*.

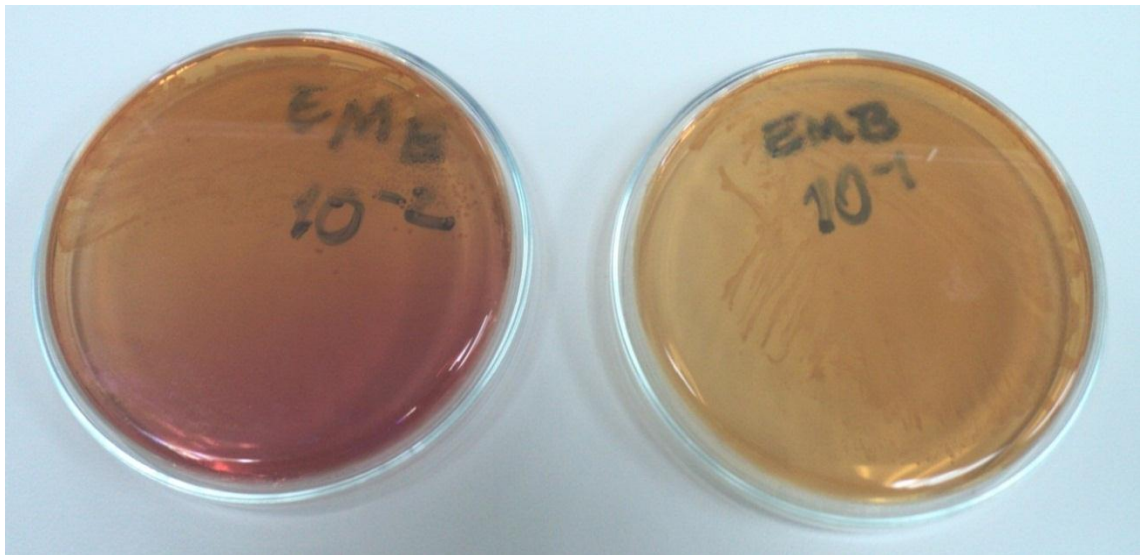


Figura Nº 64. Placas con el Medio Agar EMB.

ANEXO Nº 18

RECUENTO TOTAL COMBINADO DE HONGOS Y LEVADURAS (MÉTODO EN PLACA)

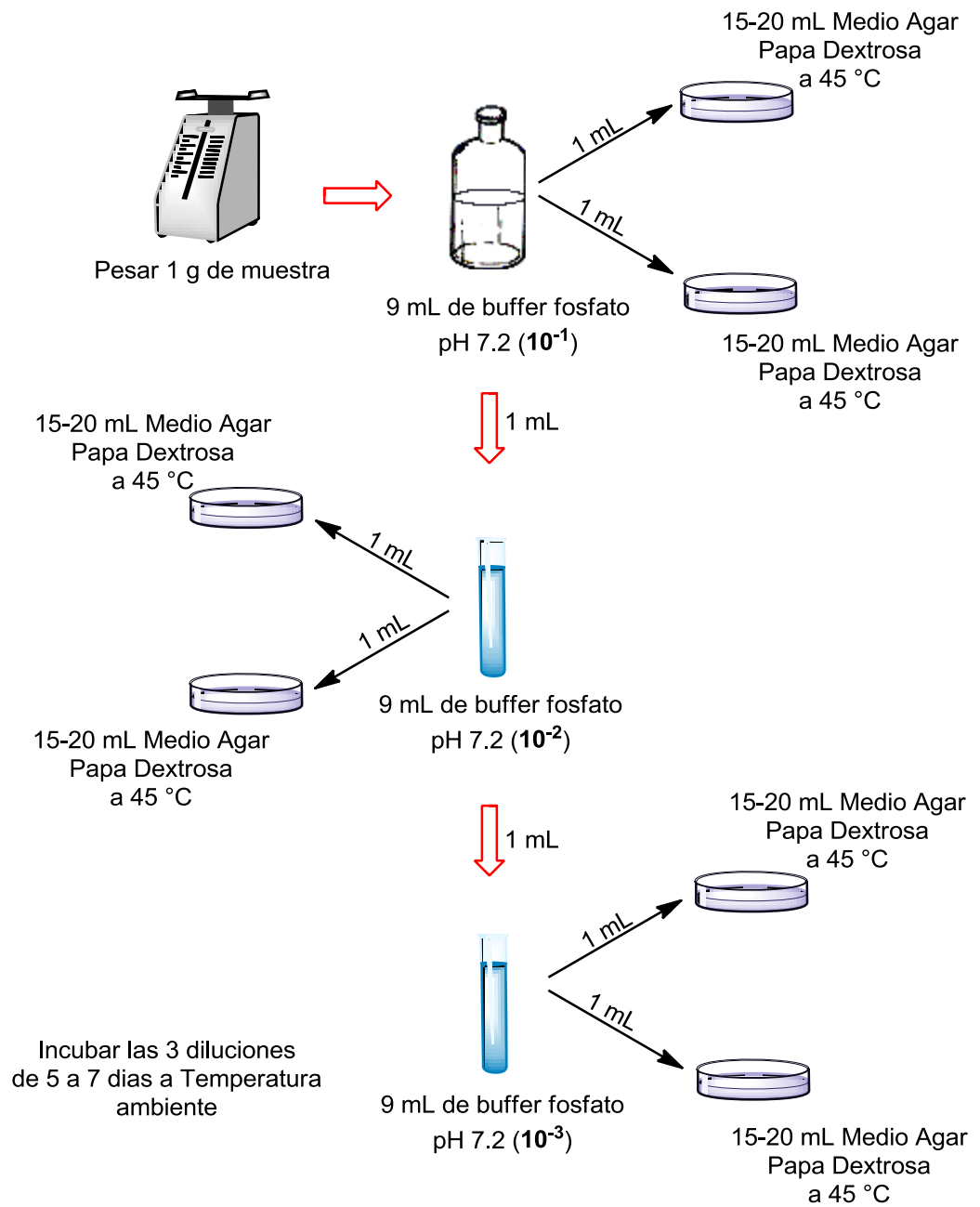


Figura Nº 65. Diagrama de Procedimiento para el recuento total de mohos y levaduras.

ANEXO Nº 19

PLACAS CON EL MEDIO AGAR PAPA DEXTROSA PARA EL RECuento TOTAL COMBINADO DE HONGOS Y LEVADURAS

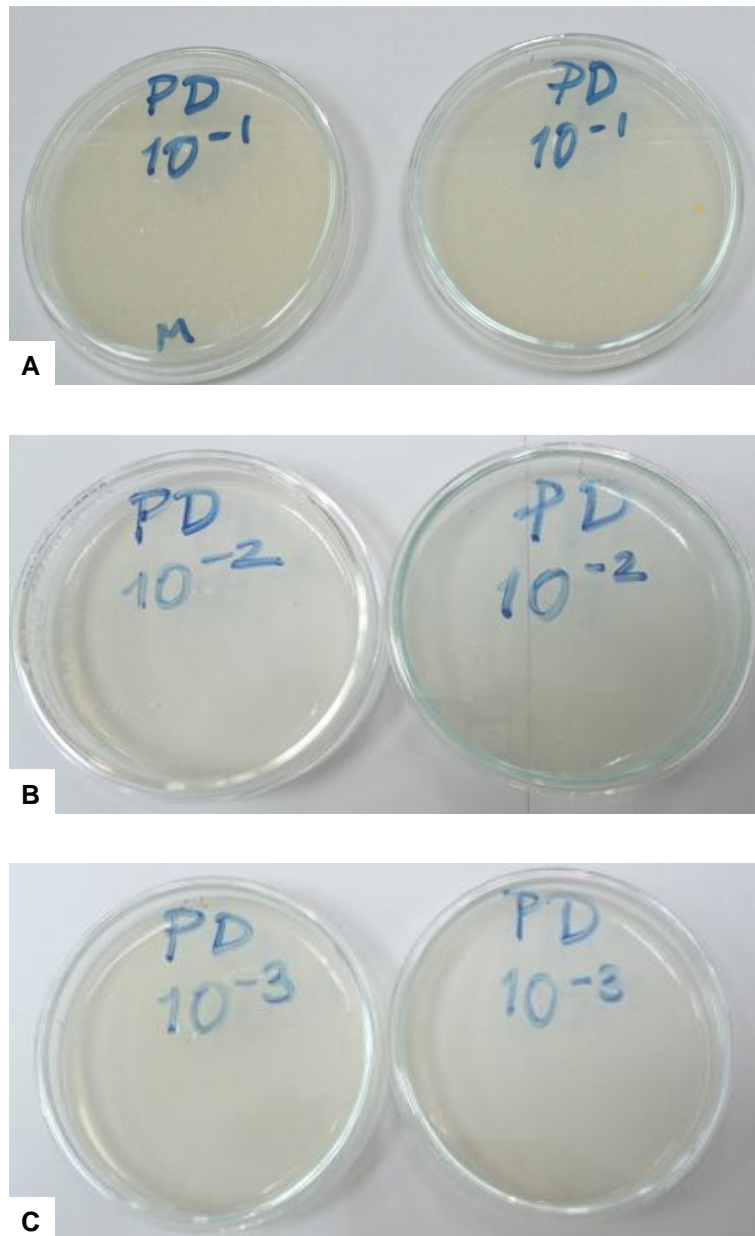


Figura N° 66. Recuento total de mohos y levaduras: **A.** Placas con el Medio Agar Papa Dextrosa, dilución 10^{-1} ; **B.** Placas con el Medio Agar Papa Dextrosa, dilución 10^{-2} ; **C.** Placas con el Medio Agar Papa Dextrosa, dilución 10^{-3} .

ANEXO Nº 20

CARTAS DE CONSENTIMIENTO INFORMADO FIRMADAS POR LOS
PACIENTES



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo Alfonso Alvarado Garcia de 35 años de edad, con número de DUI 01100459, por medio de la presente autorizo a los señores: Juan Carlos Mundo Zuna y Daniel Serrano Acosta, que pueden aplicar enzima papaína liofilizada, sobre la lesión cutánea que presento Queloides desde hace 28 años, a causa de Vacuna y que puedan verificar la actividad proteolítica de la enzima papaína sobre cicatrices de tipo queloides y verrugas, tema específico de su trabajo de graduación.

Por lo tanto, me comprometo a someterme a su tratamiento, sin ningún problema y que estoy enterado que pueden surgir efectos secundarios aun no específicos de dicho tratamiento.


Firma del paciente


Firma del testigo

Figura N° 67. Carta de consentimiento informado firmada por uno de los pacientes con cicatriz tipo queloides, tratado con la enzima papaína liofilizada



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



CARTA DE CONSENTIMIENTO
INFORMADO

Yo Miguel Ángel Alvarado de 26 años de edad, con número de DUI 20 60940 49, por medio de la presente autorizo a los señores: Juan Carlos Mundo Zuna y Daniel Serrano Acosta, que pueden aplicar enzima papaína liofilizada, sobre la lesión cutánea que presento VERRUGA desde hace 9 años, a causa de _____ y que puedan verificar la actividad proteolítica de la enzima papaína sobre cicatrices de tipo queloides y verrugas, tema específico de su trabajo de graduación.

Por lo tanto, me comprometo a someterme a su tratamiento, sin ningún problema y que estoy enterado que pueden surgir efectos secundarios aun no específicos de dicho tratamiento.

Firma del paciente

Firma del testigo

Figura N° 68. Carta de consentimiento informado firmada por uno de los pacientes con verruga, tratado con la enzima papaína liofilizada.

ANEXO Nº 21

CUADRO DE RECOLECCION DE DATOS

CODIGO DEL PACIENTE :

TIPO DE AFECCION :

EDAD DE LA AFECCION :

Parámetros antes del tratamiento			Parámetros después de 1° aplicación			Parámetros después de 2° aplicación			Parámetros después de 3° aplicación			Parámetros después de 4° aplicación		
			Largo	Ancho	Altura	Largo	Ancho	Altura	Largo	Ancho	Altura	Largo	Ancho	Altura

OBSERVACIONES :

ANEXO N° 22
APLICACIÓN DE LA ENZIMA PAPAÍNA LIOFILIZADA

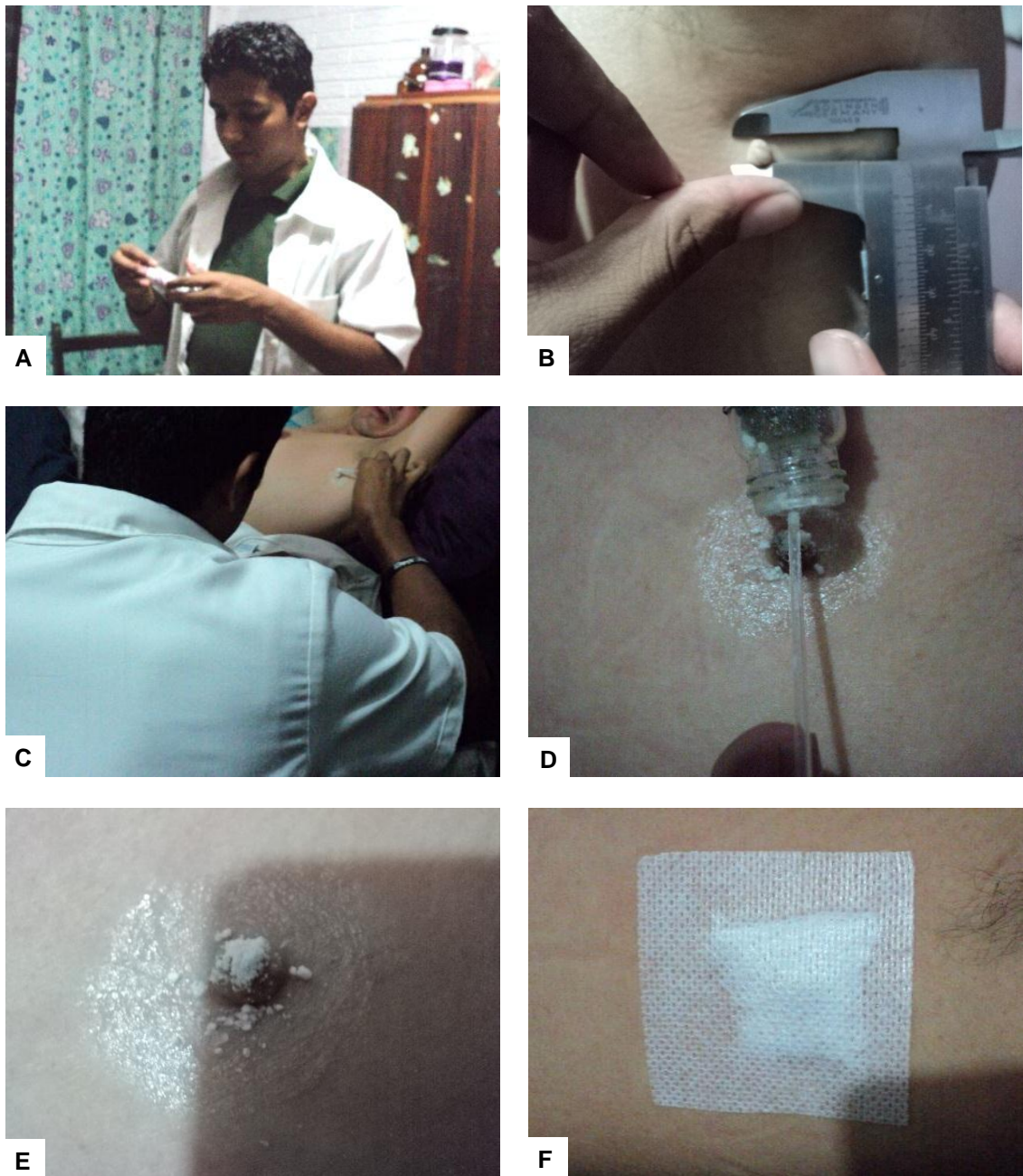


Figura N° 69. Aplicación de la enzima papaina: **A.** Preparación de los materiales para la aplicación; **B.** Toma de medidas de las dimensiones de la afección; **C.** Desinfección del area; **D y E.** aplicación de la enzima; **F.** Afección cubierta con esparadrapo luego de la aplicación.

ANEXO N° 23

INSERTO ADJUNTO DEL MEDICAMENTO CONTRACTUBEX®



Contractubex®

Gel para la terapéutica de cicatrices
Uso externo

Composición:

Extracto cepae 10 g, heparina sódica 5000 U.I., alantoína 1 g, excipientes c.s.p. 100 g.

Propiedades:

Contractubex tiene la propiedad de ablandar y alisar el tejido endurecido, protuberante, doloroso y cosméticamente molesto de las cicatrices. La heparina estimula la hidratación (capacidad de la retención hídrica) del tejido endurecido, favorece la capacidad de la humidificación relajando de esta manera las cicatrices. El extr. cepae y la alantoína apoyan este efecto ablandador. La base hidrosoluble gel introduce profundamente los principios activos en las capas de la piel haciendo posible un tratamiento localmente intensivo.

Indicaciones:

Cicatrices hipertróficas, de formación queloidal, cicatrices luego de operaciones, amputaciones, quemaduras y accidentes que limitan la movilidad y que son ópticamente deformantes; contracturas como p.ej. la de Dupuytren y contracturas tendinosas traumáticas, retracciones cicatrizales.

Contraindicaciones:

Pacientes sensibles a extracto cepae, heparina sódica, alantoína, alquil-4-hidroxi benzoatos (parabenos) o cualquier otro componente activo de este producto no deberían usar Contractubex.

Advertencias y precauciones especiales:

Contractubex contiene metil-4hidroxibenzoato, el cual puede causar reacciones alérgicas tardías. Contractubex contiene ácido sórbico, el cual puede disparar reacciones locales en la piel, ej. dermatitis de contacto.

Interacciones con otros medicamentos y otras formas de interacción:

Ninguna conocida.

Embarazo y lactancia:

No se conocen riesgos durante el embarazo ni la lactancia.

Efectos no deseados:

	Porcentajes
Muy común	> 10 %
Común	> 1 %, < 10 %
Poco común	> 0.1 %, < 1 %
Raro	> 0.01 %, < 0.1 %
Muy raro, incl. casos aislados	< 0.01 %

En general, Contractubex es bien tolerado, aún en uso a largo plazo. Sólo en muy raros casos se esperan irritaciones locales de piel.

El prurito, el cual ha sido poco comúnmente observado durante el tratamiento con Contractubex, es la manifestación del cambio cicatricial, y no requiere discontinuar el tratamiento.

Dosificación y modo de empleo:

Aplicar en la piel o en el tejido cicatrizal mediante un masaje suave varias veces al día hasta la total penetración del gel. En caso de estrías cicatrizales duras y antiguas dejar al gel que haga efecto durante la noche debajo de un vendaje. Según tamaño y profundidad de la cicatriz o contractura existentes, el tratamiento será necesario durante varias semanas o meses. En el tratamiento de cicatrices recientes, evitar las irritaciones físicas, como p. ej. el frío extremo o rayos UV, o también un masaje excesivamente enérgico.

Producto medicinal, manténgase fuera del alcance de los niños!

Presentación:

Tubos de 20 y 50 g.

Titular de la Autorización de Comercialización:

Merz Pharmaceuticals GmbH, 60318 Frankfurt am Main, Alemania.

Fabricante:

Merz Pharma GmbH & Co. KGaA, 60318 Frankfurt am Main, Alemania.

ANEXO N° 24

COMPOSICION, INDICACIONES Y ACCION TERAPEUTICA DEL MEDICAMENTO CALLOSIL®

CALLOSIL

Frasco gotero con brocha x 10 mL.



COMPOSICIÓN

Cada 10 mL Contienen:

Ácido Salicílico	2.0 g.
Ácido Láctico	0.5 g.
Polidocanol	0.2 g.

INDICACIONES Y ACCIÓN TERAPÉUTICA

Recomendado para el desprendimiento de callos, verrugas y callosidades. Produce un efecto analgésico, aliviando el dolor inmediatamente después de su aplicación

ANEXO N° 25

LISTADO DE MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, EQUIPO Y MATERIALES

MEDIOS DE CULTIVO

- Buffer Fosfato
- Medio Liquido Lactosado
- Medio Liquido Digerido de Caseína y Soya
- Medio Liquido de Selenito – Cistina
- Medio Liquido de Tetracionato
- Medio Agar Digerido de Caseína y Soya
- Medio de Agar Baird-Parker
- Medio Agar Cetrimida
- Medio Agar Xilosa Lisina Desoxicolato
- Medio Agar Sulfito de Bismuto
- Medio Agar Papa Dextrosa
- Medio Agar Eosina Azul de Metileno
- Plasma

REACTIVOS

- Hidróxido de sodio
- Ácido cítrico
- Cloruro de calcio
- Cloruro de magnesio
- Fosfato Trisódico
- Caseína Hammarstein
- Ácido tricloroacético
- Fosfato trisódico
- Fosfato de potasio monobásico

EQUIPOS

- Liofilizador Telstar Cryodos 6
- Autoclave
- Estufa
- Incubadora
- Refrigeradora
- Asas bacteriológicas en aro
- Baño de agua
- Espectrofotómetro UV-VIS
- pH metro
- Balanza analítica

MATERIALES

- Bisturís de acero
- Mecheros
- Beakers de 50 mL
- Beakers de 100 mL
- Beakers de 600 mL
- Tubos con rosca
- Balones de 250 mL
- Frascos de dilución
- Placas de Petri
- Pipetas de 1 mL
- Pipetas de 10 mL
- Pipeteador
- Erlenmeyer de 500 mL
- Erlenmeyer de 250 mL
- Balones volumétricos de 50 mL

- Balones volumétricos de 100 mL
- Balones volumétricos de 200 mL
- Embudo de vidrio
- Vidrio de reloj
- Agitadores de vidrio
- Trípode
- Malla de asbesto
- Papel de empaque
- Papel filtro Whatman 42

ANEXO N° 26

PREPARACION DE REACTIVOS

Cuadro N° 7. Materiales y procedimientos para la preparación de los reactivos utilizados en la determinación de la actividad proteolítica por el método modificado de Kunitz

REACTIVO	MATERIAL	PROCEDIMIENTO
Hidróxido de Sodio 0.2 N	<ul style="list-style-type: none"> - 4 g de NaOH - 500 mL de agua libre de CO₂ 	Disolver el NaOH en 500 mL de agua libre de CO ₂
Ácido cítrico 0.05 M	<ul style="list-style-type: none"> - 0.32 g de Ácido cítrico - 100 mL de agua destilada 	Disolver el Ácido cítrico en 100 mL de agua destilada
Agua Endurecida a 30 °DH	<ul style="list-style-type: none"> - 0.0630 g de CaCl₂.2H₂O - 0.0466 g de MgCl₂.6H₂O - 100 mL de agua destilada o buffer fosfato del pH requerido 	Disolver el CaCl ₂ .2H ₂ O y el CaCl ₂ .2H ₂ O en 100 mL de agua destilada o buffer fosfato del pH requerido
Solución de Fosfato Trisódico 2 g/L	<ul style="list-style-type: none"> - 0.4630 g de Na₃PO₄.12H₂O - 100 mL de agua destilada o buffer fosfato del pH requerido 	Disolver el Na ₃ PO ₄ .12H ₂ O en 100 mL de agua destilada o buffer fosfato del pH requerido
Substrato de Caseína	<ul style="list-style-type: none"> - 0.5 g de Caseína Hammarstein - Solución de Fosfato Trisódico 2 g/L - Agua Endurecida a 30 °DH 	<ul style="list-style-type: none"> - Disolver la caseína en 25 mL de solución de fosfato trisódico - Ajustar el pH a 9 o al pH requerido con ácido cítrico 0.05 M o NaOH 0.2 N - Calentar por 15 minutos en agua hirviendo - Enfriar - Colocar la solución en un balón volumétrico de 50 mL - Aforar la solución con el agua endurecida a 30 °DH - Ajustar el pH a 9 o al pH requerido con ácido cítrico 0.05 M o NaOH 0.2 N

Cuadro N° 7 (Continuación)

Solución de ácido tricloroacético	<ul style="list-style-type: none"> - 5 g de ácido tricloroacético - 100 mL de agua destilada 	Disolver el ácido tricloroacético en agua y diluir a 100 mL
Agua Endurecida a 15 °DH	<ul style="list-style-type: none"> - 0.0630 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0.0466 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 200 mL de agua destilada o buffer fosfato del pH requerido 	Disolver el $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y el $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 200 mL de agua destilada o buffer fosfato del pH requerido
Solución de Fosfato Trisódico 2 g/L en agua endurecida a 15 °DH	<ul style="list-style-type: none"> - 0.9260 g de $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ - 100 mL de agua endurecida a 15 °DH 	Disolver el $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ en 100 mL de agua endurecida a 15 °DH, ajustar a pH 9 o al pH requerido con ácido cítrico 0.05 M
Solución de papaína	<ul style="list-style-type: none"> - 0.0150 g de papaína - Solución de Fosfato Trisódico 2 g/L en agua endurecida a 15 °DH ajustada a pH 9 o al requerido 	<ul style="list-style-type: none"> - Disolver la papaína en solución de Fosfato Trisódico 2 g/L en agua endurecida a 15 °DH - Colocar en un balón volumétrico de 50 mL - Aforar con la solución ya mencionada
Fosfato de Potasio Monobásico 0.2 M	<ul style="list-style-type: none"> - 27.22g de KH_2PO_4 - 1 L de agua libre de CO_2 	Disolver el KH_2PO_4 en agua libre de CO_2 y aforar a 1L
Buffer Fosfato pH 9	<ul style="list-style-type: none"> - 125 mL de la solución de Fosfato 0.2 M - 14 mL de NaOH 0.2 N - Agua libre de CO_2 - Ácido cítrico 0.05 M 	Colocar la solución de Fosfato de Potasio Monobásico 0.2 M en un balón volumétrico de 500 mL, agregar el NaOH indicado y aforar con agua libre de CO_2 , ajustar al pH requerido con la solución de Ácido cítrico 0.05 M o la de NaOH 0.2 N

Cuadro N° 7 (Continuación)

<p>Buffer Fosfato pH 4.5</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 125 mL de la solución de Fosfato - Agua libre de CO₂ - Ácido cítrico 0.05 M 	<p>Colocar la solución de Fosfato de Potasio Monobásico 0.2 M en un balón volumétrico de 500 mL, y aforar con agua libre de CO₂ ajustar el pH a 4.5 con la solución de Ácido cítrico 0.05 M</p>
<p>Buffer Fosfato pH 5.5</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 125 mL de la solución de Fosfato 0.2 M - 8.25 mL de NaOH 0.2 N - Agua libre de CO₂ - Ácido cítrico 0.05 M 	<p>Colocar la solución de Fosfato de Potasio Monobásico 0.2 M en un balón volumétrico de 500 mL, agregar el NaOH indicado y aforar con agua libre de CO₂, ajustar al pH requerido con la solución de Ácido cítrico 0.05 M o la de NaOH 0.2 N</p>
<p>Buffer Fosfato pH 6</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 125 mL de la solución de Fosfato 0.2 M - 14 mL de NaOH 0.2 N - Agua libre de CO₂ - Ácido cítrico 0.05 M 	<p>Colocar la solución de Fosfato de Potasio Monobásico 0.2 M en un balón volumétrico de 500 mL, agregar el NaOH indicado y aforar con agua libre de CO₂, ajustar al pH requerido con la solución de Ácido cítrico 0.05 M o la de NaOH 0.2 N</p>