

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



**ESTUDIO PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE  
LA ENZIMA PAPAINA SOBRE CICATRICES DE TIPO  
QUELOIDES Y ESTRIAS**

TRABAJO DE GRADUACION  
PRESENTADO POR  
FATIMA DEL ROSARIO BERMUDEZ MOLINA  
ROSIBEL GUADALUPE LIPE SANABRIA

16 DE FEBRERO  
DE 1841  
PARA OPTAR AL GRADO DE:  
LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA

ENERO DE 2005  
SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA



**©2004, DERECHOS RESERVADOS**

Prohibida la reproducción total o parcial de este documento,  
sin la autorización escrita de la Universidad de El Salvador

<http://virtual.ues.edu.sv/>

**SISTEMA BIBLIOTECARIO, UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

Universidad de El Salvador

Rectora:

Dra. María Isabel Rodríguez

Secretaria General:

Licda. Alicia Margarita Rivas de Recinos

Facultad de Química y Farmacia

Decano:

Lic. Salvador Castillo Arévalo

Secretaria:

MSc. Miriam del Carmen Ramos de Aguilar

Coordinadora General:

Licda. María Concepción Odette Rauda

Asesora de Área:

Gestión Ambiental: Calidad Ambiental

Licda. Cecilia Haydee Gallardo de Velásquez

Asesora de Área:

Microbiología

Licda. Coralía de los Ángeles González de Díaz

Docentes Directores:

MSc. Sonia Marisela Lemus Martínez

Licda. Carmen Olivia Dimas

## **AGRADECIMIENTOS**

Es mi mayor deseo poder expresar mis más sinceros agradecimientos a:

Tania Cuadra, porque gracias a ella obtuvimos los reactivos para la realización de la parte fundamental de este trabajo.

Lic. Sonia Marisela Lemus, por su asesoría, sugerencias, motivación y confianza durante la realización de este trabajo.

Ing. Arturo García Mazzini, por brindarnos su valiosa ayuda en nuestro trabajo experimental y estar pendiente de todo.

Lic. Carmen Olivia Dimas, por su amabilidad de apoyarnos con su valiosa asesoría.

A mis amigas y amigos Wendy, Silvia, Ana Yanci, Esmeralda, Iris, Marina, Rafael, Mario, Vidal, Freddy de Jesús y a Rosibel por compartir con ella este trabajo, a todos por estar siempre pendientes, colaborándonos en lo que estaba a su alcance y dándonos su apoyo para salir adelante en los momentos difíciles que se nos presentaron.

Fátima.

## **Dedicatoria.**

A Dios y la Virgen de Guadalupe

A mi mamá Carmen, mi papá Ernesto, mis hermanas Tania y Karla

A mi Madrina Sor Maria Elena y a toda mi familia

Por apoyarme y estar conmigo siempre.

Fátima

## **AGRADECIMIENTOS**

Expreso mis más sinceros agradecimientos a:

- Dios todo poderoso y la Virgen de Guadalupe por iluminarme siempre.

- A nuestro docente director Licda. Sonia Maricela Lemus Martínez por su guía, confianza y por compartir sus conocimientos con nosotras.

- A nuestro docente director Licda. Carmen Olivia Dimas por su colaboración y por compartir su tiempo y experiencia con nosotras.

- Ing. Arturo García Mazzini, por colaborar en la parte experimental de esta investigación y brindarnos en todo momento su apoyo y motivación.

- A mis amigas y amigos: Wendy, Ana Yanci, Marina, Iris, Silvia, Esmeralda, Rafael, Vidal, Mario y Freddy de Jesús, por estar siempre con nosotras en las buenas y malas dándonos su apoyo, amistad y cariño. A Fátima por compartir este trabajo de graduación su amistad y confianza.

- A familia Bermúdez Molina por su amistad y cariño.

Rosibel

## DEDICATORIA

Dedico este trabajo a:

- A Dios nuestro señor, su madre santísima y madre nuestra.
- A mi madre Anabell Sanabria, abuelita Hortensia Henríquez y tía Sandra Sanabria por darme su amor, paciencia y aliento en todas las etapas de mi vida.
- A la memoria de mi padre Jorge Alberto Lipe por ser mi motivación, por sus consejos dados y por cuidarme siempre.
- A mis hermanos: Oscar, Guillermo, Jennifer, Jessica, Sandra Patricia y Kenny, y sobrino Oscar Alejandro por estar conmigo siempre.
- A mis amigas y amigos por compartir los momentos más inolvidables de mi vida, mis alegrías y tristezas.

Rosibel

## ÍNDICE

Contenido	Pág.
Capítulo I. Introducción	xvii
Capítulo II. Objetivos	
2.1 Objetivo General	20
2.2 Objetivos Específicos	20
Capítulo III. Marco Teórico	
3.1 La Piel	22
3.1.1 La epidermis	23
3.1.2 La dermis	25
3.2 Cicatrices	26
3.2.1 Formación de una cicatriz	26
3.2.2 Procedimientos para reducir cicatrices	29
3.2.3 Queloides	30
3.2.4 Cicatrices hipertróficas	32
3.3 Estrías	33
3.4 Enzimas	3
3.4.1 Generalidades	34
3.4.2 Clasificación	35

3.4.3 Características de la acción enzimática de algunas enzimas con elevada especificidad	36
3.4.4 Algunos efectos que intervienen en la desnaturalización de enzimas	36
3.5 Inmovilización de Enzimas	37
3.5.1 Definición	38
3.5.2 Ventajas de las enzimas inmovilizadas	38
3.5.3 Principales inconvenientes del proceso de inmovilización	39
3.5.4 Aplicaciones de las enzimas inmovilizadas	39
3.5.5 Propiedades de las enzimas inmovilizadas	41
3.5.5.1 Estabilidad	41
3.5.5.2 Propiedades cinéticas	42
3.5.6 Métodos de inmovilización	44
3.5.6.1 Por retención física	45
3.5.6.2 Por unión química	46
3.6 Enzimas Proteolíticas	47
3.6.1 Generalidades	47
3.6.2 Farmacodinamia	48
3.6.3 Usos terapéuticos	48
3.6.4 Reacciones adversas	48
3.6.5 Precauciones y contraindicaciones	48
3.6.6 Interacciones con otras drogas	49

3.7 Enzima Papaína	49
3.7.1 Generalidades	49
3.7.2 Aplicaciones Industriales	50
3.7.3 Características de la papaína	51
3.7.4 Ventajas de la papaína	52
3.7.5 Estructura	53
3.7.6 Propiedades físicas	53
3.7.7 Sitio activo	54
Capítulo IV. Diseño Metodológico	
4.1 Investigación Bibliográfica	57
4.2 Investigación de Campo	57
4.3 Tipo de Estudio	58
4.3.1 Experimental	58
4.3.2 Retrospectivo / Prospectivo	58
4.3.3 Longitudinal	58
4.4 Universo y Muestra	58
4.5 Métodos e Instrumentos de Recolección de Datos	59
4.6 Metodología Experimental	59
4.6.1 Inmovilización de la enzima. Inmovilización en Agar – Agar	59
4.6.1.1 Preparación del soporte.	59
4.6.1.2 Mezcla enzima-soporte.	60
4.6.1.3 Moldeo de la enzima en placas.	60

4.7 Determinación de la Actividad proteolítica de la Enzima Papaína	
Libre e Inmovilizada	61
4.7.1 Ensayo General de Actividad.	61
4.7.1.1 Método Modificado de Kunitz	61
4.7.1.2 Ensayo de la Actividad Enzimática en Relación con el pH.	64
4.7.1.3 Ensayo de la Actividad Enzimática en Relación a la Temperatura.	64
4.7.1.4 Determinación de la Actividad en Unidades Kunitz.	64
4.8 Preformulación de Preparados Tópicos de Enzima Libre e Inmovilizada.	65
4.8.1 Elaboración de la solución tópica de enzima libre al 1.0%	65
4.8.2 Elaborar bandas de enzima papaína inmovilizada al 10.0%.	65
4.8.2.1 Preparar solución de Agar-Agar.	65
4.8.2.2 Mezcla enzima papaína – Agar-Agar.	65
4.8.2.3 Moldeo de la enzima en placas.	66
4.9 Ensayo Clínico de la Enzima Papaína Libre e Inmovilizada en Pacientes.	67
4.9.1 Método de aplicación de enzima libre.	67
4.9.2 Método de aplicación de enzima inmovilizada.	67
Capítulo V. Resultados.	
5.1 Resultados de la Determinación de la Actividad proteolítica de la enzima papaína libre e inmovilizada.	69

5.1.1 Resultados del Método de Actividad Enzimática a diferentes pH y Temperatura constante de 40°C.	70
5.1.2 Resultados de los Ensayos de Actividad Enzimática en Relación con los Cambios de Temperatura (pH 6.0)	72
5.1.3 Resultados de los Ensayos de Actividad Enzimática en Relación con los Cambios de Temperatura. (pH 7.0)	74
5.2 Preformulación de preparados de enzima libre al 1.0, 3.0, y 5.0.% y de enzima inmovilizada al 10.0 %.	76
5.3 Aplicación de preparados tópicos de enzima libre e inmovilizada.	76
5.4 Evaluación del efecto proteolítico de la enzima papaína	77
Capítulo VI Análisis de Resultados.	
6.1 En la determinación de la Actividad Proteolítica de la Enzima Papaína: pH y temperatura óptima.	80
6.2 Evaluación del efecto proteolítico en cicatrices de tipo queloides y estrías, por medio de la aplicación de preparados tópicos de enzima libre al 1.0, 3.0 y 5.0% y de enzima inmovilizada al 10.0%.	82
Capítulo VII. Conclusiones.	
Capítulo VIII. Recomendaciones.	
Bibliografía	
Anexos	

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Pág.
1. Usos Industriales de la Papaína	52
2. Propiedades Físicas de la Papaína	54
3. Actividad de Enzima Libre e Inmovilizada frente a los cambios de pH.(T° Constante de 40°C.)	70
4. Porcentaje de Actividad de Enzima Libre e Inmovilizada frente a los cambios de pH. (T° Constante de 40°C.)	70
5. Actividad de Enzima Libre e Inmovilizada frente a los cambios de Temperaturas. (pH 6.0 constante)	72
6. Porcentaje de Actividad de Enzima Libre e Inmovilizada frente a los cambios de Temperatura. (pH 6.0)	72
7. Actividad de Enzima Libre e Inmovilizada frente a los cambios de Temperatura. (pH 7.0 constante)	74
8. Porcentaje de Actividad de Enzima Libre e Inmovilizada frente a los cambios de Temperatura. (pH 7.0 constante)	74
9. Cambios de Cicatrices por Aplicación de Preparados Tópicos de Enzima Libre e Inmovilizada.	78

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
1-2 Cicatrices tipo queloide	30
3-6 Zonas de aparición de estrías	34
7 Método de inmovilización mediante retención física	44
8 Método de inmovilización mediante unión química	45
9 Tríada catalítica de la enzima papaína	55
10 Gráfico de Porcentaje de Actividad de Enzima Libre e Inmovilizada frente a los cambios de pH (T° constante 40°C)	71
11 Gráfico de Porcentaje de Actividad de Enzima Libre e Inmovilizada frente a los cambios de Temperatura (pH 6.0)	73
12 Gráfico de Porcentaje de Actividad de Enzima Libre e Inmovilizada frente a los cambios de Temperatura (pH 7.0)	75

## ABREVIATURAS

Abreviatura o símbolo	Significado
°C	Grados Celsius
cm	Centímetros
g	Gramos
min	Minutos
mg	Miligramos
ml	Mililitro
mm	Milímetro
nm	Nanómetro
s	Segundos
$E_{15}$	Absorbancia después de 15 min. de reacción de enzima libre
$E_0$	Absorbancia inicial de enzima libre
$E_0'$	Solución de papaína
$I_{15}$	Absorbancia después de 15 min. de reacción de enzima inmovilizada
$I_0$	Absorbancia inicial de enzima inmovilizada
$I_0'$	Papaína inmovilizada

CAPITULO I  
INTRODUCCIÓN

## 1. INTRODUCCIÓN

La piel es el límite exterior entre el ser humano y su entorno, por lo que está expuesta a sufrir lesiones denominadas cicatrices, que son ocasionadas por diferentes causas, es decir, que el 99% de la población presentan cicatrices.

Para esta investigación se seleccionaron las estrías y los queloides, los queloides son cicatrices que afectan la vida de una persona modificando su apariencia estética afectando su desarrollo personal y profesional, produciendo además molestias como ardor, dolor y prurito. Las estrías, aparecen en zonas no tan visibles del cuerpo como el abdomen y las caderas, producen problemas emocionales y profesionales al igual que los queloides pero en un grado menor. Existen tratamientos para mejorar el aspecto de una cicatriz, entre ellos están los quirúrgicos y rayos láser; pero dichos tratamientos presentan el inconveniente de no ser accesibles para la mayoría de la población debido a su alto costo, riesgos para la vida del paciente, al ser aplicados a los queloides, crecen el doble de su tamaño original.

En el medio ambiente existen recursos que pueden ser aprovechados como es el caso del látex del Papayo (**Carica papaya**), planta propia del trópico que puede cultivarse con facilidad, ella contiene la enzima papaína. Dicha enzima es la más potente de las enzimas proteolíticas siendo una hidrolasa, que actúa a nivel de los enlaces peptídicos de las proteínas. (8)

Según investigaciones anteriores, se puede comprobar la utilidad que dicha enzima tiene en la industria y en el tratamiento de lesiones de la piel, como es el caso de tratamientos realizados en pacientes que presentaron despigmentación de la piel, en cicatrices causadas por quemaduras, se utilizó cultivos de queratinócitos a los cuales se les aplicaron dosis de 0.5% de papaína dando resultados muy favorables .<sup>(5)</sup>

En el año 2000, se realizó un trabajo de investigación “Normalización de la Enzima Papaína Inmovilizada por la Técnica de Atrapamiento en Gel”. Que describe la técnica de atrapamiento en diferentes tipos de soportes y presenta métodos para determinar la actividad de la enzima papaína tomando en cuenta diferentes temperaturas y pH.<sup>(6)</sup>

En base a lo anterior se desarrolló esta investigación, determinando el pH y Temperatura óptima de actividad enzimática de la papaína por el método modificado de Kunitz., llevándose a cabo el procedimiento en los Laboratorios de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador. Además con esta información se preformularon preparados tópicos, en dos presentaciones: uno solución de enzima en estado libre en concentraciones de 1.0, 3.0 y 5.0%, y el otro en bandas de enzima inmovilizada en Agar –Agar al 10.0 %. Aplicándose durante un mes a 12 pacientes ambulatorios.

Los resultados obtenidos se analizaron por observación utilizando fotografías que fueron tomadas antes y después del tratamiento. Con el propósito de darle la población una alternativa segura y natural para el mejoramiento de cicatrices.

CAPITULO II

OBJETIVOS

## 2. OBJETIVOS.

### 2.1 OBJETIVO GENERAL.

Realizar un estudio preliminar de la actividad proteolítica de la enzima papaína sobre cicatrices de tipo queloides y estrías.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

2.2.1 Medir la actividad proteolítica de la enzima papaína libre e inmovilizada por el Método Modificado de Kunitz a diferentes temperaturas y pH.

2.2.2 Preformular preparados de enzima libre al 1.0, 3.0, y 5.0% y de enzima inmovilizada por técnica de atrapamiento en gel al 10.0 %.

2.2.3 Aplicar los preparados en el período de 1 mes, a 12 pacientes ambulatorios que presentan cicatrices de tipo queloides y estrías.

2.2.4 Evaluar el efecto proteolítico de la enzima papaína libre e inmovilizada en el mejoramiento estético de queloides y estrías.



CAPITULO III  
MARCO TEÓRICO

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 LA PIEL

La piel es un órgano, ya que esta 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 los adultos, la piel cubre un área de alrededor de 2 m<sup>2</sup> 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. La epidermis está unida a una capa más gruesa e interna, compuesta por tejido conjuntivo y llamada fascia superficial o hipodermis, constituida por tejido areolar y adiposo.

La piel desarrolla varias funciones:

1. Regulación de la temperatura corporal: como respuesta a una alta temperatura ambiental 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 ambiental, disminuye la producción de sudor, lo que ayuda a conservar el calor.
2. 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.

3. Sensibilidad: la piel contiene abundantes terminaciones nerviosas y receptores que detectan los estímulos relacionados con la temperatura, el tacto, la presión y el dolor.
4. Excreción: además de eliminar el calor y una cierta cantidad de agua del organismo, el sudor es el vehículo para la excreción de pequeñas cantidades de sales y de varios compuestos orgánicos.
5. Inmunidad: determinadas células de la epidermis son componentes importantes del sistema inmune, que mantiene alejados a los invasores extraños.
6. 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.
7. Síntesis de vitamina D: la síntesis de ésta 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

La epidermis esta 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 cúbicas o cilíndricas contiene a las células precursoras capaces de una división continuada y a los melanocitos. Las células precursoras se multiplican y producen queratinocitos, que emigran hacia 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 estrato 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 que se mantienen íntimamente unidas adaptándose entre ellas. Estas células parecen estar cubiertas por espinas (de ahí su nombre). En cada proyección en forma de espina, los filamentos del 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 o 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 capa más 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 a 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, sólo la piel gruesa de las palmas de las manos y 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 intermediaria 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.

### 3.1.2 La dermis

La segunda porción fundamental de la piel, esta 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 de las manos y las plantas de los pies 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. <sup>(17)</sup>

La estructura de la piel y los procesos fisiológicos que en ella se producen facilitan las diferentes funciones integrales entre ellas: repara las heridas superficiales acelerando el proceso normal de renovación celular.

A lo largo del tiempo la piel está expuesta a sufrir lesiones cutáneas las cuales causan en la mayoría de veces traumatismos en las capas de la piel nos referimos a las cicatrices. <sup>(10)</sup>

## 3.2 CICATRICES.

### 3.2.1 Formación de una cicatriz.

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

Si la herida es profunda, el cuerpo deposita una proteína llamada colágeno para reparar el daño.

En algunos casos se deposita mucho colágeno y la herida se vuelve roja y abultada. Estas son las cicatrices que son muy llamativas e inestéticas

Al principio la cicatriz es roja y abultada. Al pasar el tiempo, las cicatrices se aplanan y se vuelven menos notorias. Existen casos en que la cicatriz se mantiene abultada, se ensanchan siendo poco atractivas. Están frecuentemente asociadas a una variedad de características que incluyen endurecimiento, protuberancias que asemejan a una gruesa cuerda, y un exceso de color sobre todo pardo o marrón, también puede crecer mas allá de los límites de la herida inicial formado masas pardas muy desagradables estéticamente, son los llamados queloides.

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 ésta 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 esperará este período 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. <sup>(13)</sup>

Las cicatrices suelen desaparecer con el tiempo. Mientras se curan, se puede utilizar maquillaje para cubrirlas. Existen determinadas técnicas dermatológicas que ayudan a hacer menos visibles las cicatrices. No obstante, el tratamiento sólo mejora la apariencia de la cicatriz, pero no la borra por completo.

### 3.2.2 Procedimientos que se suelen emplear para reducir las cicatrices:

#### - Dermabrasión

La dermabrasión 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 (de la vaca) 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.<sup>(7)</sup>

### 3.2.3 Queloides



Figura 1



Figura 2

Figura 1 y 2. Cicatrices tipo queloide

Agrupaciones irregulares, redondeadas y gruesas de tejido cicatricial que se forman en la zona de una herida, pero que no coinciden con los bordes de esa herida. A menudo son de color rojo o más oscuras, en comparación con la piel normal circundante. Los queloides se forman con el colágeno que el cuerpo produce después de 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.

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

- Inyecciones de esteroides

Los esteroides se inyectan directamente 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 un medicamento.

- Terapia de presión

La terapia de presión requiere la utilización de un tipo de dispositivo de presión que se aplica sobre la zona de la cicatriz. Puede utilizarse día y noche durante un período de cuatro a seis meses.

- Cirugía

Si la cicatriz que loide 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 la zona donante) y colocándolo en la zona que carece de piel.

Otra opción es la cirugía con láser. Las cicatrices pueden tratarse con una variedad de láser diferentes según cuál sea la causa de la herida. Los rayos láser 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 lo 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.

#### 3.2.4 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 suelen 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. <sup>(9)</sup>

### 3.3 ESTRÍAS

Las estrías son cicatrices ocasionadas por una ruptura de las fibras dérmicas de la piel. Cuando aparecen son rojizas y, generalmente, después del parto pierden color y se van tornando blanquecinas y menos evidentes.

Son muy comunes en el embarazo ya que el aumento de peso y el estiramiento de la piel afectan el colágeno y la elastina de la piel, dando como resultado la aparición de estrías. Sin embargo, existen pieles mucho más sensibles y con mayor predisposición a su aparición que otras. No es posible que las estrías desaparezcan por completo, lo que se puede hacer es que se vuelvan completamente lisas y casi invisibles. <sup>(9)</sup> (Ver figura en Pág. 34)



Figura 3. Muslo



Figura 4. Abdomen



Figura 5. Axila

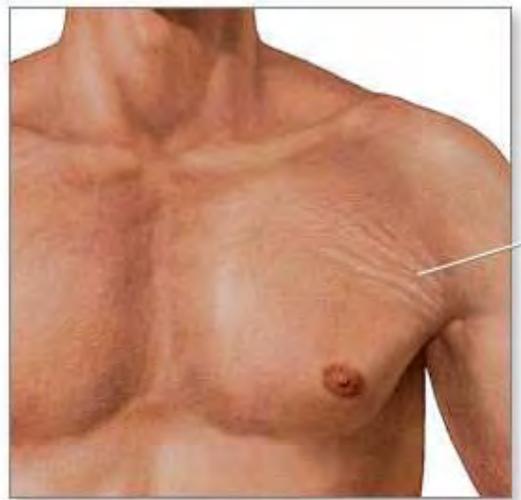


Figura 6. Axila

Figura 3, 4, 5 y 6. Zonas de aparición de estrías.

### 3.4 ENZIMAS

#### 3.4.1 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 de los equilibrios químicos pero si aceleran su ejecución. Por ser catalizadores aceleran reacciones químicas para hacerlas instantáneas o casi instantáneas.

### 3.4.2 Clasificación.

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:

1. Oxidoreductasas, catalizan reacciones de oxidación – reducción.

Ejemplos: alcohol deshidrogenasa, glucosa 1-deshidrogenasa, manitol 2-deshidrogenasa, benzaldehido deshidrogenasa (NADP+), etc.

2. Transferasas, catalizan reacciones de transferencia de grupo.

Ejemplos: nicotinamida N-metiltransferasa, histamina N-metiltransferasa, homocisteina S-metiltransferasa, glicina N-metiltransferasa, etc.

3. Hidrolasas, catalizan reacciones hidrolíticas.

Ejemplos: arilestearasa, galactolipasa, papaína, quimopapaína, etc.

4. Liasas, catalizan la extracción no hidrolítica de grupos para la formación de dobles enlaces.

Ejemplos: piruvato descarboxilasa, acetolactato descarboxilasa, lisina descarboxilasa, metionina descarboxilasa, etc.

5. Isomerasas, catalizan isomerizaciones.

Ejemplos: alanina racemasa, metionina racemasa, aspartato racemasa, isopenicilina N- epimerasa, etc.

6. Ligasas, catalizan la formación de enlaces sin hidrólisis de nucleósidos trifosfato.

Ejemplos: tirosina –tRNA ligasa, glicina – tRNA ligasa, fenilalanina – tRNA ligasa, arginina – tRNA ligasa, etc.

3.4.3 Características de la acción enzimática más sobresalientes de algunas enzimas con elevada especificidad.

1. Especificidad del sustrato: El sustrato es la molécula sobre la cual, la enzima ejerce su acción catalítica.
2. Especificidad de acción: Cada reacción esta catalizada por una enzima especifica. (12)

3.4.4 Algunos de los efectos que intervienen en la desnaturalización de 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 de la enzima de 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 calor también desnaturaliza las enzimas, de modo que a medida que aumenta la temperatura la actividad de la enzima tiende a bajar. (12)

### 3.5 INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS.

Los procesos catalizados por enzimas en la industria son cada día más numerosos, ya que presentan una serie de ventajas frente a los catalizadores convencionales no biológicos:

- Presentan una gran actividad catalítica;
- Muestran una gran especificidad de sustrato
- Son muy activos a temperatura ambiente y presión atmosférica.

A pesar de estas ventajas, el empleo de enzimas no se ha generalizado en los procesos químicos industriales debido a que la mayoría de las enzimas no son estables en las condiciones de trabajo.

Por otra parte al ser solubles en agua, su separación de los sustratos y productos es difícil, y por tanto, no se pueden reutilizar.

Con la inmovilización de las enzimas se han podido superar estos inconvenientes, permitiendo que el proceso biotecnológico sea económicamente rentable.(2)

### 3.5.1 Definición.

La inmovilización de enzimas es: un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente.<sup>(3)</sup>

Posteriormente esta definición se ha ampliado a aquel proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas, organélos, células, etc. Por su unión a un soporte.

También se dice que una enzima inmovilizada es la que físicamente está conectada a un apoyo sólido y que además estará en contacto con un sustrato y será convertida en producto.

### 3.5.2 Como ventajas de enzimas inmovilizadas podemos destacar:

1. El aumento de la estabilidad de la enzima;
2. La posible reutilización del derivado, por lo que disminuyen los costos del proceso.
3. La posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control, adaptado a la aplicación de la enzima inmovilizada. Estos reactores con enzimas inmovilizadas permiten el empleo de cargas elevadas de enzima, la cual mantendrá su actividad durante más tiempo. <sup>(2)</sup>

3.5.3 Los principales inconvenientes del proceso de inmovilización son:

1. La alteración de la conformación de la enzima respecto de su estado nativo.
2. La gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte donde pueden existir distintas fracciones de proteínas inmovilizadas con un diferente número de uniones al soporte.
3. Siempre suele haber una pérdida de actividad de la enzima durante la inmovilización.
4. El biocatalizador es más caro que la enzima nativa.<sup>(2)</sup>

3.5.4 Aplicaciones de las enzimas inmovilizadas.

Las aplicaciones más importantes de las enzimas inmovilizadas se pueden clasificar en:

#### 1. Analíticas

Biosensores, generalmente el biosensor contiene una molécula biológica inmovilizada (enzimas, células, anticuerpos) próxima a un traductor que, en contacto con el analito, transformará la señal química producida en una señal eléctrica o de otro tipo (óptica, calorimétrica, acústica, etc.)

#### 2. Médicas

Tratamientos con enzimas inmovilizadas. Existen muchas enfermedades causadas por una alteración o carencia de una determinada enzima. También hay enzimas con actividad antitumoral, cicatrizante y con otras acciones

terapéuticas. El tratamiento con estas enzimas inmovilizadas permitiría una acción más prolongada, ya que serían más resistentes a la acción de las proteasas.

### 3. Industria Farmacéutica

Los enzimas son unos reactivos quirales estrictos, es decir, biocatalizadores con una estructura tridimensional asimétrica definida que permiten la obtención de productos de gran pureza óptica. Se trata de una ventaja fundamental cuando las reglamentaciones exigen la síntesis de compuestos ópticamente puros, ya sean fármacos, hormonas o antibióticos.

### 4. Industria Alimentaria

- En la hidrólisis de proteínas
- En la hidrólisis de hidratos de carbono
- En la mejora de las características organolépticas de ciertos alimentos
- En la obtención de edulcorantes y aditivos alimentarios

### 5. Industria Química

La obtención industrial de acrilamida, compuesto ampliamente utilizado en la preparación de diferentes polímeros, aditivos y en el tratamiento del petróleo.

La obtención de productos de alto valor añadido es también un campo importante para la síntesis catalizada por enzimas inmovilizadas. Como ejemplos podríamos citar la síntesis de péptidos, fragancias e insecticidas.

## 6. Tratamientos de aguas residuales

Desarrollo de un método para la reducción de nitratos a nitritos en aguas residuales que emplea enzimas inmovilizadas. El benceno es otro compuesto muy tóxico que puede ser degradado mediante células de *Pseudomonas putida* atrapadas en geles de poliacrilamida. <sup>(2)</sup>

### 3.5.5 Propiedades de las enzimas inmovilizadas

Las técnicas de inmovilización pueden producir cambios en las propiedades físicas y químicas de las enzimas durante la inmovilización. Cambios que se relacionan con la estabilidad y propiedades cinéticas de las mismas, debido al microambiente impuesto por el soporte y los productos de su propia acción.

#### 3.5.5.1 Estabilidad

La estabilidad de una enzima inmovilizada depende generalmente de la naturaleza intrínseca de cada enzima y de las condiciones en las que se ha inmovilizado. <sup>(6)</sup>

Generalmente la estabilidad tiende a aumentar, si el portador proporciona un ambiente microbiológico capaz de estabilizar la enzima y tiende a disminuir si el portador es capaz de desnaturalizar la proteína enzimática.

La complejidad global de los factores que afectan a la estabilidad enzimática sugiere, que la única aproximación factible es de obtener datos experimentales bajo las condiciones a utilizar. <sup>(3)</sup>

#### 3.5.5.2 Propiedades Cinéticas.

La cinética enzimática estudia factores físicos y químicos que influyen en la inmovilización enzimática.

Además, la actividad de la enzima también se puede ver disminuida e incluso perderse por diversas razones.

Si pierde totalmente la actividad enzimática puede ser debido a que:

1. La unión al soporte se produce de tal forma que el paso del sustrato al centro activo está impedido,
2. Los grupos reactivos del soporte reaccionan con algún aminoácido que forme parte del centro activo o que sea esencial para la actividad catalítica de la enzima.
3. La inmovilización puede originar un cambio conformacional que da lugar a una forma inactiva.
4. Las condiciones experimentales del proceso causan la desnaturalización o desactivación de la enzima.

Si la pérdida de actividad no es total después de la inmovilización, los cambios (disminución o aumento de la actividad enzimática) se deberán principalmente a efectos:

a) Difusionales, como consecuencia de la inmovilización, la difusión de los sustratos hacia el centro activo de la enzima puede estar impedida por resistencias de tipo externo e interno.

b) Electrostáticos entre el sustrato y el soporte, de tal manera que, si tienen la misma carga existe una repulsión mutua, mientras que si las cargas son opuestas hay atracción.

c) Impedimentos estéricos o de tamaño de sustrato. En un principio, cualquier enzima puede ser inmovilizada sin que haya una pérdida apreciable de su actividad. Este hecho suele ser válido en el caso de que el sustrato sea de bajo peso molecular, pero si se trata de sustratos con pesos moleculares elevados, la actividad de la enzima inmovilizada disminuye drásticamente.

d) Microentorno: La enzima inmovilizada se encuentra en un entorno diferente al habitual, especialmente cuando el soporte tiene grupos cargados eléctricamente. El efecto observado suele ser un desplazamiento en el valor del pH óptimo de la actividad enzimática y, muchas veces, un ensanchamiento en el intervalo de pH en el cual la enzima puede actuar. (2)

### 3.5.6 Métodos de inmovilización.

Para la inmovilización de una enzima a una superficie, es muy importante escoger un método que prevendrá la pérdida de actividad de enzima sin cambiar su naturaleza química o grupos reactivos con el sitio obligatorio de la enzima, sin embargo un sitio activo puede ser protegido por un sustrato o un inhibidor competitivo de la enzima.

En general, los métodos de inmovilización se suelen clasificar en dos grandes categorías (2):

1) *Retención física* (Ver figura 7)

2) *Unión química* (Ver figura 8)

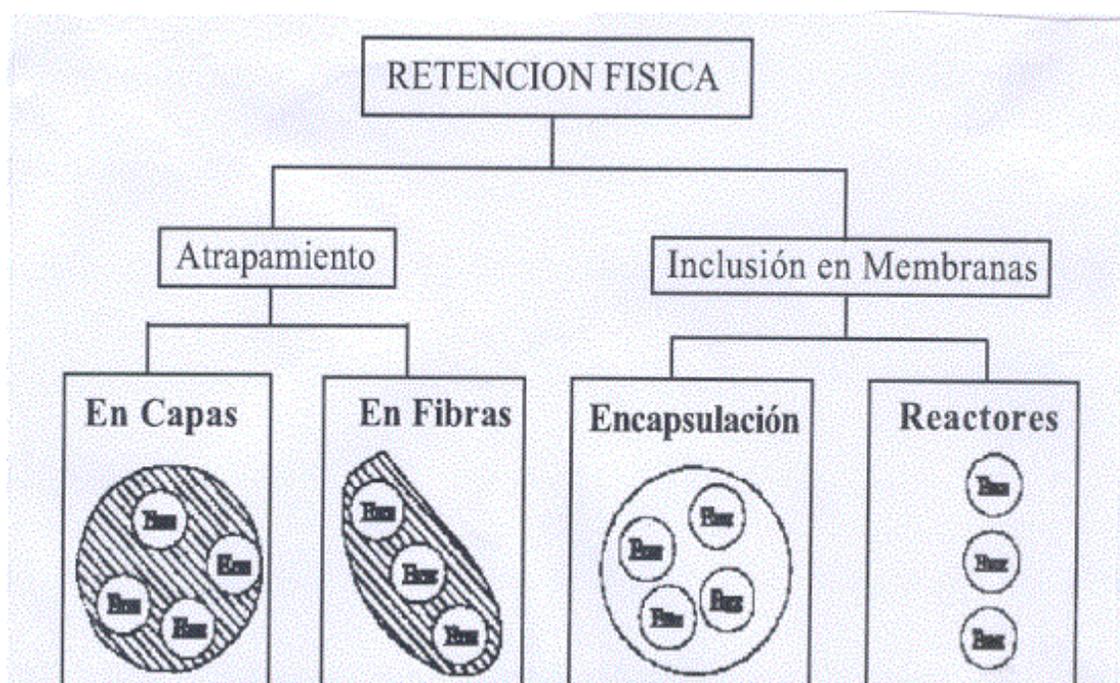


Figura 7. Método de inmovilización mediante retención física

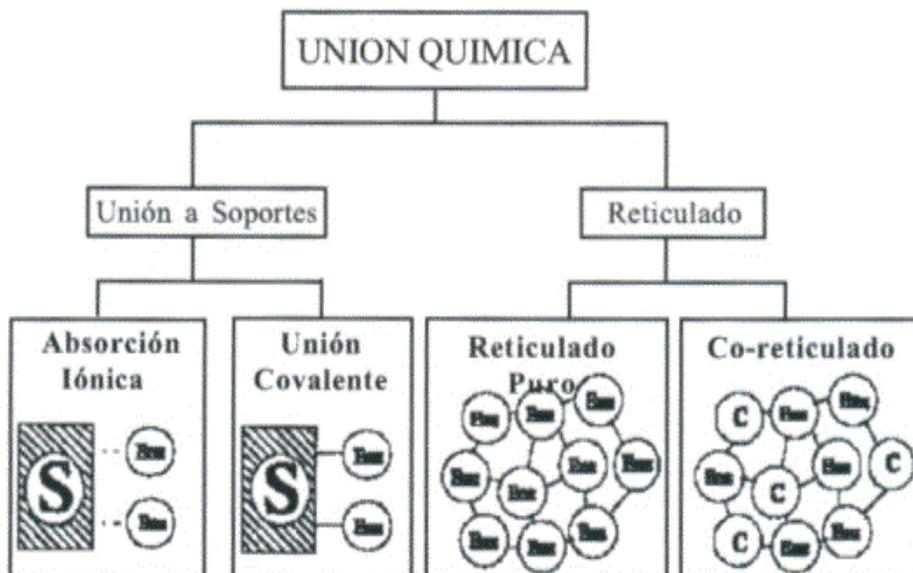


Figura 8. Método de inmovilización mediante unión química

### 3.5.6.1 Métodos de inmovilización de enzimas por retención física.

#### a) Atrapamiento.

Consiste en la retención física de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa. El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima en una solución del monómero.

El atrapamiento puede ser en geles o en fibras, que suelen ser más resistentes que los geles. En el primer caso, la enzima queda atrapada en el interior de un gel, mientras que en el segundo caso la enzima se encuentra ocluida dentro de las microcavidades de una fibra sintética. El atrapamiento, de gran sencillez desde el punto de vista experimental, requiere poca cantidad de enzima para

obtener derivados activos. Como ventaja adicional, la enzima no sufre ninguna alteración en su estructura.

b) Inclusión en membranas: Dividida en dos tipos:

- Microencapsulación: En esta técnica, las enzimas están rodeadas de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto, pero no de enzima.

- Reactores de membrana: El desarrollo de reactores o sistemas que contengan enzimas atrapadas ha despertado gran interés en la industria. Estos reactores emplean membranas permeables al producto final, permeables o no al sustrato inicial y obviamente impermeables a la enzima.

#### 3.5.6.2 Métodos de inmovilización de enzimas por unión química.

##### *a) Unión a soportes*

La elección del soporte y del tipo de enlace resulta determinante en el comportamiento posterior del biocatalizador. Se debe procurar que la inmovilización incremente la afinidad por el sustrato, disminuya la inhibición, amplíe el intervalo de pH óptimo y reduzca las posibles contaminaciones microbianas. Además el soporte debe tener resistencia mecánica adecuada a las condiciones de operación del reactor y ser fácilmente separable del medio líquido para que pueda ser reutilizado.

Este método a su vez se divide en:

- Adsorción: En la adsorción, la enzima se une a un soporte sin funcionalizar mediante interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals y por puentes de hidrógeno.
- Unión covalente: Se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas.

#### *b) Reticulado*

Que se divide en:

- Reticulado propiamente dicho: El método del reticulado consiste en uso de reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de enzima. El resultado del reticulado son enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura.
- Co-reticulado: Este permite eliminar las pérdidas de actividad enzimática debidas a efectos difusionales, mediante el entrecruzamiento de las enzimas con una proteína sin actividad enzimática <sup>(2)</sup>

### 3.6 ENZIMAS PROTEOLÍTICAS.

#### 3.6.1 Generalidades.

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

### 3.6.2 Farmacodinamia.

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

### 3.6.3 Usos terapéuticos:

Las enzimas proteolíticas son aplicadas tópicamente sobre la superficie de una herida provocando el desbridamiento de ésta.

Algunas son administradas sistémicamente con el propósito de disolver coágulos intravasculares 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.

### 3.6.4 Reacciones adversas:

La vía tópica es la más utilizada, puede presentarse hipersensibilidad en, 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.

### 3.6.5 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.

### 3.6.6 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 hidrógeno, 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 <sup>(14)</sup>.

## 3.7 ENZIMA PAPAÍNA.

### 3.7.1 Generalidades.

Es una enzima proteolítica que es aislada del látex que exuda el fruto verde del Papayo (***Carica papaya***).

Es esencialmente una mezcla de proteasas, siendo separada en dos fracciones, siendo la primera la papaína propiamente dicha y la segunda la quimopapaína, internacionalmente reconocida, por la adición de lactosa, o en formulaciones líquidas preparadas con glicerol o sorbitol.

La nueva tecnología, ha permitido obtener la papaína en forma purificada, esterilizada, pulverizada, posible de formar una solución clara, en esa forma la

enzima presentará mejor actividad biológica, también tiene la ventaja de mayor estabilidad y mejor aspecto microbiológico, además, que ofrece mayores posibilidades de mantenerlo bajo control.

Hidroliza proteínas, amidas y ésteres de aminoácidos.

La actividad de esta se presenta en unidades de actividad biológica.

Estudios realizados afirman que la máxima actividad enzimática en términos de temperatura, ocurre entre 40 y 65°C. Temperaturas superiores a esta conducen a una inactivación irreversible de enzima. Además actúa en pH entre 3 y 9 pero se considera que inferiores y superiores a este rango es inactivada.<sup>(5)</sup>

### 3.7.2 Aplicaciones Industriales

La papaína proteasa sulfhídrica que se obtiene a partir del látex de ***Carica papaya*** tiene muchas aplicaciones en diversas industrias.

En todas estas industrias la papaína se ve involucrada por la actividad de ésta o la capacidad de actuar como un catalizador y cuanto mayor sea la actividad específica por unidad de peso de la enzima más valiosa ha de ser esta y por lo tanto mayor será la protección de esa actividad en la producción, almacenamiento y producción de la materia prima.

Por lo tanto se considera que la papaína hace frente a la competencia de otros procedimientos en el seno de varias industrias, según la investigación y desarrollo que estén realizándose en cada una de estas.<sup>(18)</sup>

Tabla 1. Usos Industriales de la Papaína <sup>(18)</sup>

<i>Industria</i>	<i>Porcentaje de utilización</i>
Industria cervecera	75.0%
Industria carnica	3.0%
Saborizantes	5.0%
Industria farmacéutica	7.0%
Industria panificadora	2.0%
Industria textil	1.0%
Industria del cuero	1.0%
Industria cosmética	2.0%

### 3.7.3 Características de la papaína.

-Apariencia: Polvo poco blanco o con tinte amarillento o levemente marrón, cuando se encuentra en mezcla de lactosa como vehículo.

-Olor: Característico, típico de papaína, con intensidad variable.

-Actividad enzimática: conforme lo declare lo rotulado.

-Solubilidad: Soluble en agua, levemente opalescente suele ocurrir, insoluble en alcohol y acetona.

-Estabilidad: Buena estabilidad en cuanto a mezclas secas, en ausencia de humedad, agentes oxidantes o metales pesados. Soluciones acuosas son estables por tiempo limitado y deben ser preparadas extemporáneamente cuando se desee usos efectivos. Reducción de actividad enzimática inferior a

1% después de seis meses de almacenamiento a temperatura ambiente de hasta 40°C.

En general, la papaína en su empaque original, podrá ser útil por lo menos un año, cuando es refrigerada y con garantía sin perder su actividad enzimática.

Su aplicación local desempeña su actividad proteolítica específica sobre tejidos muertos, sin afectar los tejidos. La limpieza enzimática de la herida por acción de la papaína, instala un proceso cicatrizante más tranquilo e inestético.

La papaína es aplicada tópicamente en concentraciones entre 2 – 5% en forma de pomadas y de 0.5 – 1% utilizando soluciones preparadas extemporáneamente.<sup>(19)</sup>

#### 3.7.4 Ventajas de la papaína.

- Calidad y actividad enzimática
- Estabilidad en condiciones desfavorables de temperatura, humedad y presión atmosférica
- Se encuentra en alta concentración en el látex que se extrae de la papaya
- Posee un alto valor comercial por la diversidad de usos que presenta. <sup>(19)</sup>

### 3.7.5 Estructura.

La papaína es clasificada como una enzima, hidrolasa y proteasa tiólica. Existe como un monómero, consistente de 212 residuos. Es una proteína simple que contiene aminoácidos y está desprovista de carbohidratos. (Ver anexo 3)

La estructura cristalina se determinó por difracción de rayos X su dimensión celular es 65.7 x 50.7 x 31.5 Amstrongs, desarrolladas en dos estructuras cristalinas una ortorrómbica y otra monoclinica. (6)

### 3.7.6 Propiedades físicas

Tabla 2. Propiedades Físicas de la Papaína (6)

Propiedad	Valor
Punto isoelectrico	pH 8.75
Constante de sedimentación, $S_{20 w}$	$2.42 \pm 0.04$ seg.
Constante de difusión, $D_{20 w}$	$10.27 \pm 0.13 \times 10^7$ cm <sup>2</sup> seg. <sup>-1</sup>
Peso molecular	23.350 daltons
Coefficiente de extinción, $E_{1 \text{ cm } 280 \text{ nm}}$	25.0
Rotación óptica (pH 5.7, 25°C) $[\alpha]_D$	-66.7

### 3.7.7 Sitio activo.

La interacción entre enzima y substrato se da 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, pero si el SH de la Cisteína, no se encuentra libre por un bloqueo de 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 tríada catalítica que forma el sitio activo de la papaína. (Ver figura 9)

En ausencia de una adición de activadores, existe una correlación lineal entre la actividad catalítica de la papaína y su contenido tiólico.

La papaína es activada por una gran variedad de compuestos tiólicos tales como la cisteína y el glutatión, así como por agentes reductores los cuales pueden actuar también como quelantes. (8)

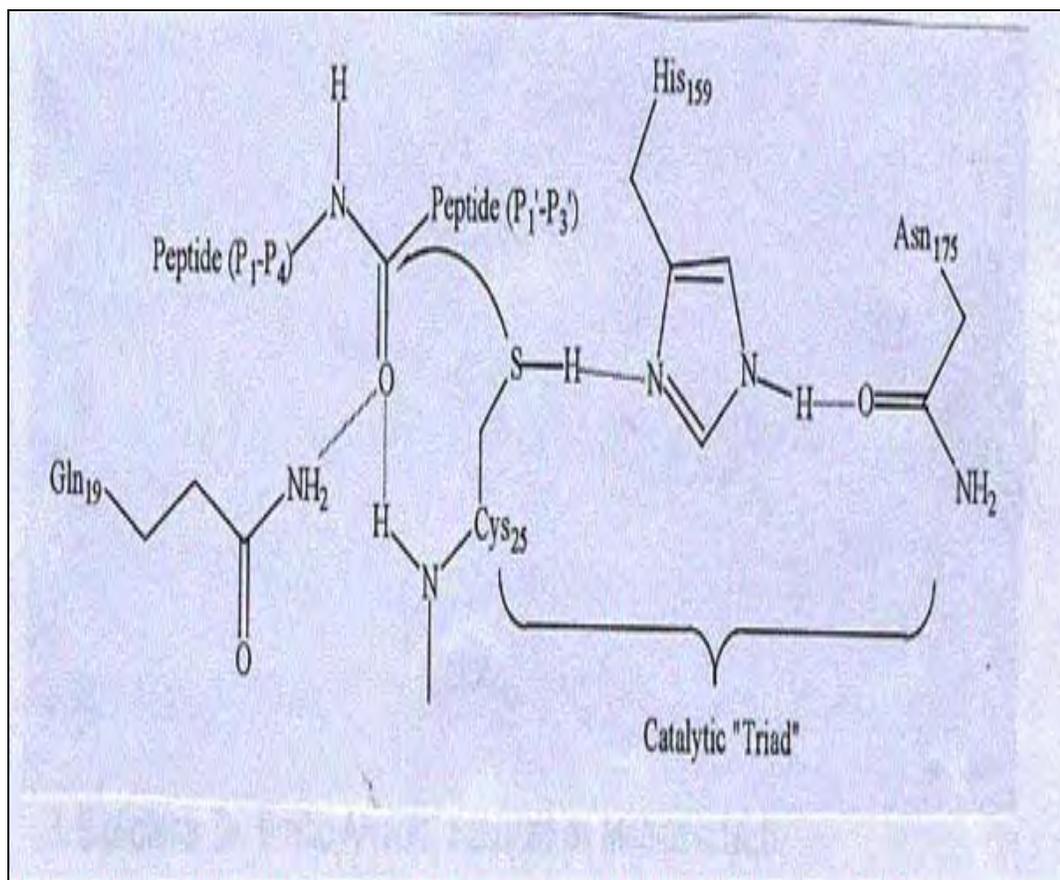


Figura 9. Tríada catalítica de la enzima papaína<sup>(3)</sup>

CAPITULO IV  
DISEÑO METODOLÓGICO

## 4. DISEÑO METODOLÓGICO.

Se dividió en:

### 4.1 INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA

- Biblioteca Dr. Alfonso Rochac de la Fundación Salvadoreña para el Desarrollo.
- Biblioteca Dr. Benjamín Orozco, Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador.
- Biblioteca Dr. Emilio Álvarez, Facultad de Medicina. Universidad de El Salvador
- Búsqueda en sitios de Internet.

### 4.2 INVESTIGACIÓN DE CAMPO.

Se realizó en dos etapas:

La primera que consistió en la determinación de la actividad enzimática de la papaína por el método modificado de Kunitz, procedimiento que se desarrolló en el área de los Laboratorios de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador. Proceso tomado de la tesis "Normalización de la Enzima Papaína Inmovilizada por la Técnica de Atrapamiento en Gel".<sup>(6)</sup>

La segunda etapa fue la preformulación y aplicación del preparado tópico de enzima libre e inmovilizada a diferentes concentraciones 1.0, 3.0, 5.0 y 10.0%.

### 4.3 TIPO DE ESTUDIO

Dicha investigación fue un estudio Experimental, Retrospectivo / Prospectivo y Longitudinal.

4.3.1 Experimental, porque a través de la aplicación de un preparado tópico de Papaína a un grupo de 12 pacientes ambulatorios seleccionados al azar se comprobó la efectividad de dicha enzima en el mejoramiento estético de cicatrices de tipo queloides y estrías.

4.3.2 Retrospectivo / Prospectivo, porque existen estudios anteriores a esta investigación que sirvieron como base para demostrar las diferentes aplicaciones de dicha enzima en tratamientos de la piel y a la vez se obtuvieron nuevos datos teórico-práctico con respecto a la aplicación de la enzima papaína sobre el mejoramiento de queloides y estrías.

4.3.3 Longitudinal, porque existió un límite de tiempo de un mes para la aplicación tópica del preparado y la obtención de resultados.

### 4.4 UNIVERSO Y MUESTRA.

El universo de la investigación fueron doce pacientes ambulatorios seleccionados al azar que presentaron queloides y estrías, del cual se tomaron muestra de tres pacientes para cada una de las concentraciones del preparado

de enzima libre ( 1.0, 3.0 y 5.0%) y tres pacientes que se trataron con bandas de enzima inmovilizada con una concentración del 10.0%

#### 4.5 MÉTODOS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

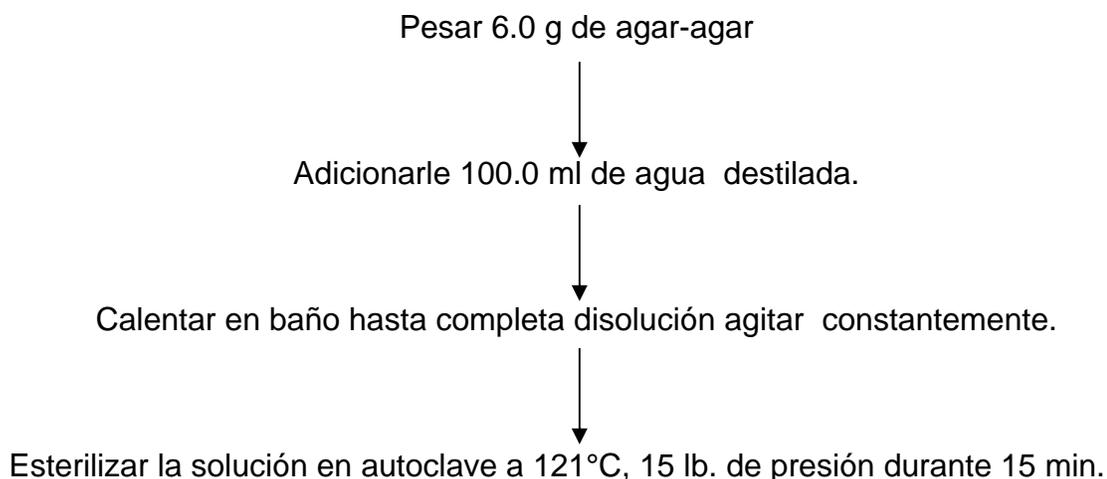
El instrumento de medición fue observativo (Ver anexo 16) el cual consistió en fotografías tomadas antes, y después del tratamiento, con esto se determinaron los cambios que surgieron en cuanto al aspecto físico de los queloides y estrías.

En las cicatrices de tipo queuloide los parámetros medidos fueron el largo, ancho y espesor del queuloide, en las estrías de igual forma agregando además el grado de visibilidad que ellas presentaban.

#### 4.6 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

##### 4.6.1 Inmovilización de la enzima. Inmovilización en Agar - Agar

##### 4.6.1.1 Preparación del soporte.





Enfriar hasta temperatura de 60°C y mantener en baño María.  
Repetir los pasos anteriores utilizando 7.0 y 8.0 g de agar-agar en preparaciones individuales del soporte.

#### 4.6.1.2 Mezcla enzima-soporte

Pesar 400.0 mg de enzima papaína. —————> Mezclar la enzima con la solución de Agar-Agar a 47°C.

Agitar por 3 min.

—————> Mantener en baño de agua a 45°C

#### 4.6.1.3 Moldeo de la enzima en placas.

Esterilizar con alcohol isopropílico 1 placa de vidrio 15 x 15 cm.



Colocar las placas horizontalmente sobre papel encerado.



Dispersar una capa delgada aproximadamente de 1 mm de la mezcla enzima-soporte sobre las placas, auxiliándose de una espátula estéril.

Dejar reposar a temperatura ambiente hasta la solidificación del gel (1 min.)



Remover y lavar las placas con agua destilada estéril y almacenar las placas en una solución de agua destilada estéril a 10°C.

#### 4.7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE LA ENZIMA PAPAÍNA LIBRE E INMOVILIZADA.

Es importante tener presente los cambios que experimenta la enzima libre e inmovilizada con respecto a sus propiedades, es por eso que en base al desarrollo del ensayo de actividad por el Método Modificado de Kunitz, se verifica el efecto del cambio del pH y el efecto del cambio de temperatura de la enzima, por un contacto directo que esta tiene con el sustrato presente en la reacción.

##### 4.7.1 Ensayo General de Actividad.

Para medir la actividad proteolítica de la papaína se utilizó el Método Modificado de Kunitz, basado en el grado de hidrólisis de sustratos proteicos.

##### 4.7.1.1 Método Modificado de Kunitz (Realizado para pH 6.0, T°= 40°C)

Paso A. Se prepararán seis tubos rotulados así:

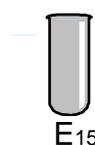


Agregar 1 ml sustrato caseína pH 6.0, previamente regulado con NaOH 0.2 N o ác. cítrico 0.5 M (Ver Anexo 5)

## Paso B.

Calentar por 10 min. en baño maría a temperatura de 40 °C

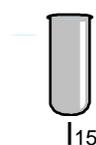
## Paso C.



Agregar 1 ml de solución de papaína pH 6.0

(Ver Anexo 5)

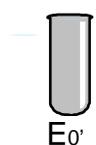
Colocar en baño María.



Colocar la cantidad de enzima inmovilizada equivalente a 1 ml de solución de

papaína. (Ver Anexo 8)

Colocar en baño María.



Agregar 1 ml de solución de papaína pH 6.0

(Ver Anexo 5)

Colocar en baño

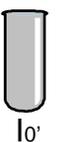
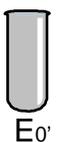
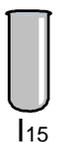
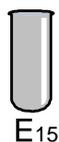
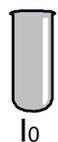
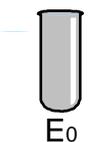


Colocar la cantidad de enzima inmovilizada equivalente a 1 ml de solución de

papaína. (Ver Anexo 8)

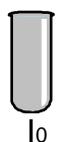
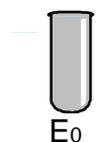
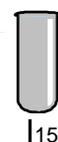
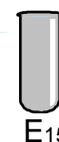
Colocar en baño María.

## Paso D.



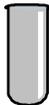
Incubar los tubos durante 15 min. A temperatura de 40 °C

## Paso E.



Adicionar 3 ml de ácido tricloroacético a cada tubo

Paso F. En este momento cada uno de los tubos contiene:

 E <sub>15</sub>	 I <sub>15</sub>	 E <sub>0</sub>
1 ml Substrato Caseína pH 6.0 1 ml sln. Papaína pH 6 3 ml ác. tricloroacético	1 ml Substrato Caseína pH 6.0 0.075 g. de enzima inmovilizada 3 ml ác. Tricloroacético	1 ml Substrato Caseína pH 6.0
 I <sub>0</sub>	 E <sub>0</sub> '	 I <sub>0</sub> '
1 ml Substrato Caseína pH 6.0	1 ml sln. Papaína pH 6.0 3 ml ác. tricloroacético	0.075 g. de enzima inmovilizada 3 ml ác. Tricloroacético

Paso G.

Añadir el contenido del tubo E<sub>0</sub> en el tubo E<sub>0</sub>' y el del tubo I<sub>0</sub> en el I<sub>0</sub>'.

Colocar de nuevo los tubos calentando baño María a 40 °C durante una hora.

Paso H.

Filtrar con papel filtro Whatman No. 42 ó su equivalente

Paso I.

Leer la absorbancia de los filtrados a 280 nm en Espectrofotómetro UV-VIS llevando un blanco (solución de ácido tricloroacético).

#### 4.7.1.2 Ensayo de la Actividad Enzimática en Relación con el pH.

- a. Preparar soluciones de buffer fosfato a pH 6.0, 7.0, 7.5. (Ver Anexo 6). Para el ensayo a pH 9.0 no se prepara buffer. (Ver Anexo 6)
- b. Preparar el substrato caseína y la solución de papaína ajustados para cada uno de los pH.
- c. Desarrollar el ensayo de actividad como indica el Método Modificado de Kunitz. Siempre manteniendo la temperatura constante de 40°C.

#### 4.7.1.3 Ensayo de la Actividad Enzimática en Relación a la Temperatura.

- a. Preparar soluciones de buffer fosfato a pH 6.0, 7.0. (Ver Anexo 6).
- b. Preparar el substrato caseína y la solución de papaína ajustados para cada uno de los pH.
- c. Desarrollar el ensayo de actividad como indica el Método Modificado de Kunitz. Variando la temperatura a 37, 40, 50, 60°C.

#### 4.7.1.4 Determinación de la Actividad en Unidades Kunitz (Ver Anexo 9)

#### 4.8 PREFORMULACIÓN DE PREPARADOS TÓPICOS DE ENZIMA LIBRE E INMOVILIZADA.

##### 4.8.1 Elaboración de la solución tópica de enzima libre al 1.0 %.

Pesar en balanza analítica 0.15 g de enzima papaína.



Transferir la enzima a un frasco previamente tarado.



Agregar 15 ml de buffer pH 6



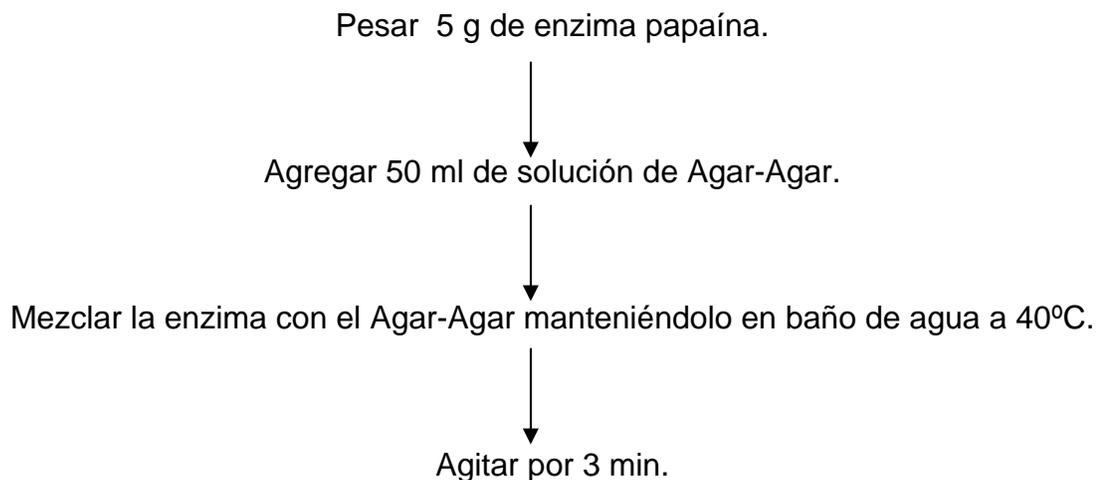
Agitar 1 minuto.

Repetir el procedimiento anterior utilizando 0.45 g. de enzima papaína para obtener el 3.0% y 0.75 g. de enzima papaína para obtener el 5.0% de concentración de ambas soluciones.

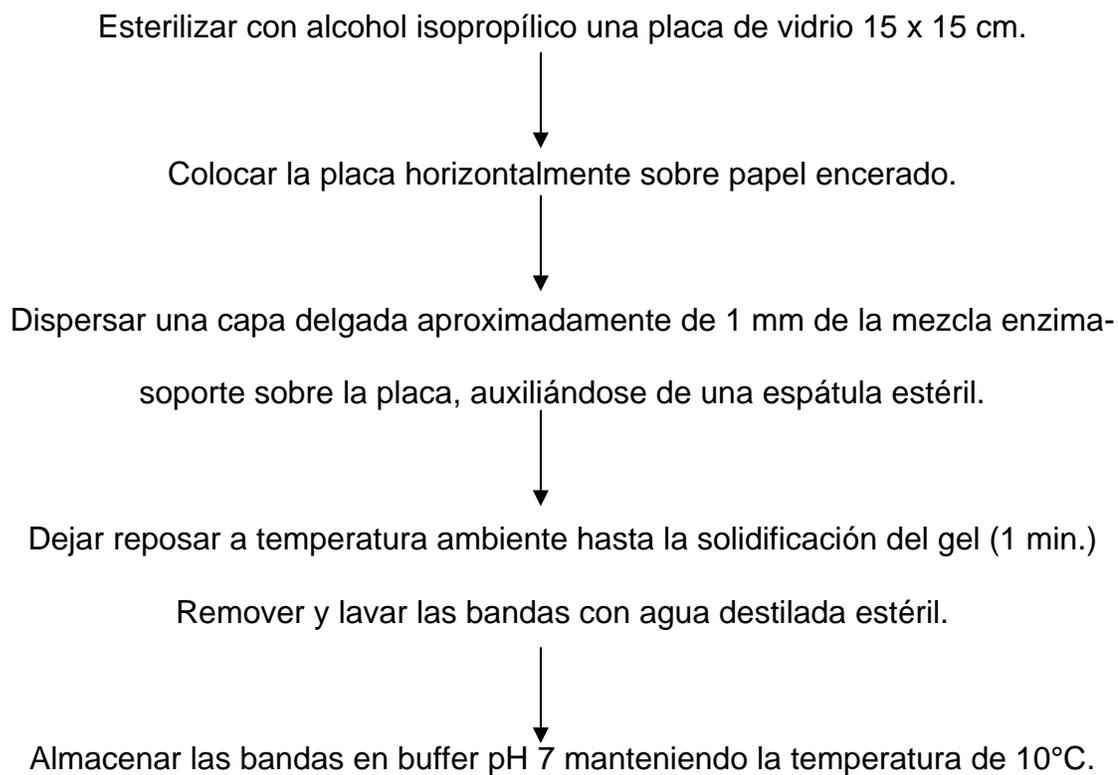
##### 4.8.2 Elaborar bandas de enzima papaína inmovilizada al 10.0%

###### 4.8.2.1 Preparar solución de Agar-Agar. (Ver Anexo 7)

###### 4.8.2.2 Mezcla enzima papaína – Agar-Agar. (Ver procedimiento en Pág. 66)



#### 4.8.2.3 Moldeo de la enzima en placas.



#### 4.9 ENSAYO CLÍNICO DE LA ENZIMA PAPAÍNA LIBRE E INMOVILIZADA EN PACIENTES.

##### 4.9.1 Método de aplicación de enzima libre.

- a. Limpiar el área de la cicatriz con agua tibia y dejar secar.
- b. Con la ayuda de una brocha previamente impregnada de la solución de enzima papaína aplicar sobre el área de la cicatriz y dejar secar. (Ver anexo 12)
- c. Repetir el proceso cada doce horas.

##### 4.9.2 Método de aplicación de enzima inmovilizada.

- a. Limpiar el área de la cicatriz con agua tibia y dejar secar.
- b. Con la ayuda de una pinza tomar las bandas y colocarlas sobre la superficie de la cicatriz por una hora, cada doce horas. (Ver Anexo 12)
- c. Colocar nuevamente la banda en la solución de buffer pH 7.0, ya que será reutilizada en el período de una semana.

CAPITULO V  
RESULTADOS

## 5. RESULTADOS.

### 5.5 RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE LA ENZIMA PAPAÍNA LIBRE E INMOVILIZADA.

Para la determinación de la actividad proteolítica de la enzima papaína se desarrolló por el Método Modificado de Kunitz (ver 4.7.1.1). Método que permite calcular la actividad enzimática de la papaína por el incremento de la absorbancia del substrato caseína causado por la hidrólisis de la enzima.

Este método se realizó en dos estados de la enzima, tanto libre como inmovilizada, a diferentes pH 9.0; 7.5; 7.0 y 6.0 a una temperatura constante de 40 °C.

La temperatura óptima se obtuvo variando las temperaturas 37°, 40°, 50° y 60 °C manteniendo constante el pH de 6.0 para enzima libre, y para la inmovilizada manteniendo constante el pH de 7.0 <sup>(6)</sup>.

5.1.1 Resultados del Método de Actividad Enzimática a diferentes pH y Temperatura constante de 40°C.

Tabla 3. Actividad de Enzima Libre e Inmovilizada frente a los cambios de pH. (T° Constante de 40°C.) (Ver Anexo 9)

pH	Actividad Enzima Libre (Unidad Kunitz)	Actividad Enzima Inmovilizada (Unidad Kunitz)
6.0	$2.580 \times 10^4$	$0.293 \times 10^4$
7.0	$1.906 \times 10^4$	$0.766 \times 10^4$
7.5	$1.203 \times 10^4$	$0.563 \times 10^4$
9.0	$1.036 \times 10^4$	$0.043 \times 10^4$

Tabla 4. Porcentaje de Actividad de Enzima Libre e Inmovilizada frente a los cambios de pH. (T°= 40°C.) (Ver Anexo 9)

pH	Porcentaje de Actividad de Enzima Libre	Porcentaje de Actividad de Enzima Inmovilizada
6.0	100.00	38.25
7.0	73.87	100.00
7.5	46.63	73.49
9.0	40.15	5.61

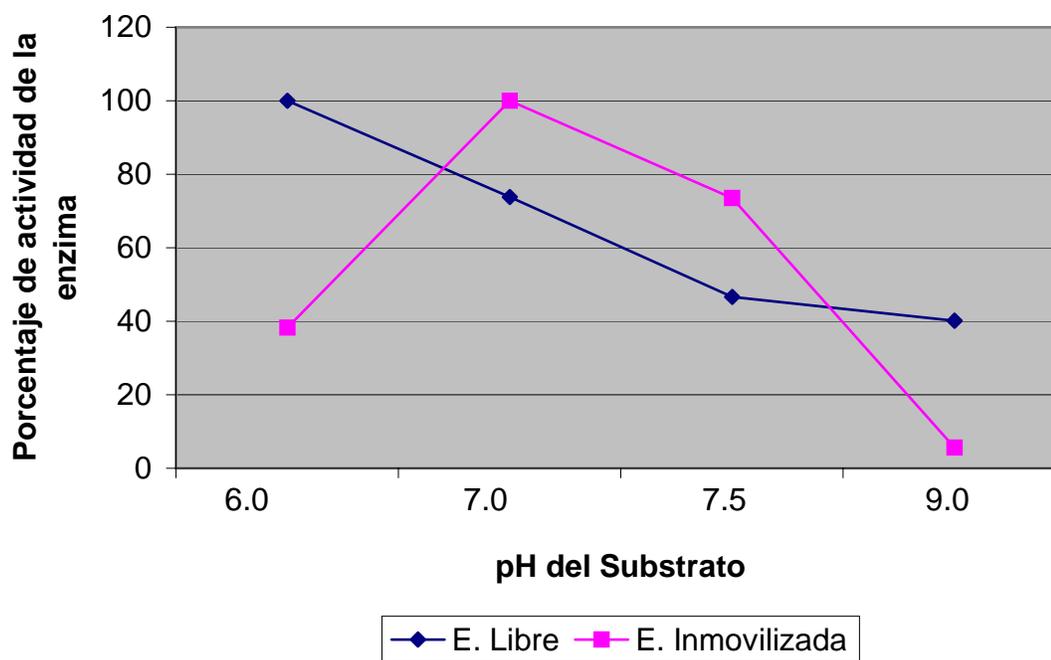


Figura 10. Gráfico de Porcentaje de Actividad de Enzima Libre e Inmovilizada frente a los cambios de pH. ( $T^{\circ}$  constante  $40^{\circ}\text{C}$ )

Según la tabla 4 y figura 10, muestra que, a un pH de 6 la enzima libre actúa en un 100% de su actividad y que la enzima inmovilizada a un pH de 7 actúa en un 100% de su actividad.

### 5.1.2 Resultados de los Ensayos de Actividad Enzimática en Relación con los Cambios de Temperatura (pH 6.0)

Este ensayo de actividad es realizado inicialmente a pH 6.0 por ser el pH óptimo obtenido para la enzima libre a temperatura constante de 40°C.

Tabla 5. Actividad de Enzima Libre e Inmovilizada frente a los cambios de Temperaturas. (pH 6.0 constante) (Ver Anexo 9)

Temperatura (°C)	Actividad Enzima Libre (Unidad Kunitz)	Actividad Enzima Inmovilizada (Unidad Kunitz)
37	$1.313 \times 10^4$	$0.276 \times 10^4$
40	$2.580 \times 10^4$	$0.293 \times 10^4$
50	$2.916 \times 10^4$	$0.520 \times 10^4$
60	$3.346 \times 10^4$	$0.683 \times 10^4$

Tabla 6. Porcentaje de Actividad de Enzima Libre e Inmovilizada frente a los cambios de Temperatura. (pH 6.0) (Ver anexo 9)

Temperatura (°C)	Porcentaje Actividad Enzima Libre	Porcentaje Actividad Enzima Inmovilizada
37	39.24	40.41
40	77.11	42.89
50	87.15	76.13
60	100.00	100.00

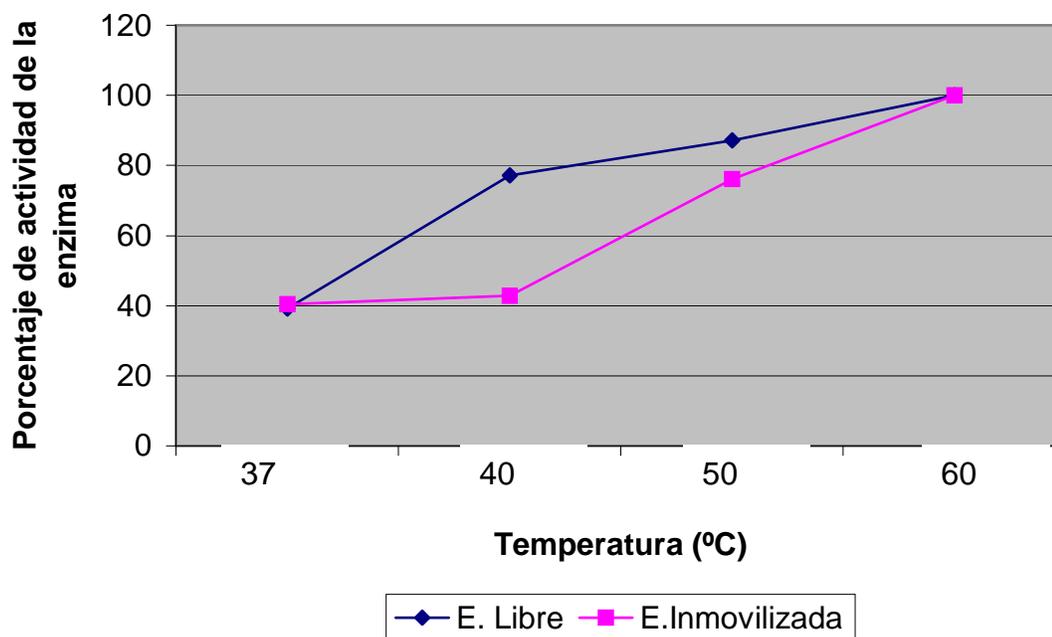


Figura 11. Gráfico de Porcentaje de Actividad de Enzima Libre e Inmovilizada frente a los cambios de Temperatura (pH 6.0)

Según la tabla 6 y figura 11, muestra que, a una temperatura de 60°C, tanto la enzima libre como inmovilizada actúan en un 100% de su actividad.

Para la enzima inmovilizada el aumento de temperatura se verifica a partir de los 40°C, no así la enzima libre que aumenta en una forma gradual desde la temperatura de 37°C.

### 5.1.3 Resultados de los Ensayos de Actividad Enzimática en Relación con los Cambios de Temperatura. (pH 7.0)

Este ensayo es realizado a este pH, por ser el pH óptimo que presentó la enzima inmovilizada a una temperatura constante de 40°C.

Tabla 7. Actividad de Enzima Libre e Inmovilizada frente a los cambios de Temperatura. (pH 7.0 constante) (Ver anexo 9)

Temperatura (°C)	Actividad Enzima Libre (Unidad Kunitz)	Actividad Enzima Inmovilizada (Unidad Kunitz)
37	$1.680 \times 10^4$	$0.673 \times 10^4$
40	$1.906 \times 10^4$	$0.766 \times 10^4$
50	$2.266 \times 10^4$	$0.976 \times 10^4$
60	$2.703 \times 10^4$	$1.113 \times 10^4$

Tabla 8. Porcentaje de Actividad de Enzima Libre e Inmovilizada frente a los cambios de Temperatura. (pH 7.0) (Ver anexo 9)

Temperatura (°C)	Porcentaje Actividad Enzima Libre	Porcentaje Actividad Enzima Inmovilizada
37	62.15	60.46
40	70.51	68.82
50	83.83	87.69
60	100.00	100.00

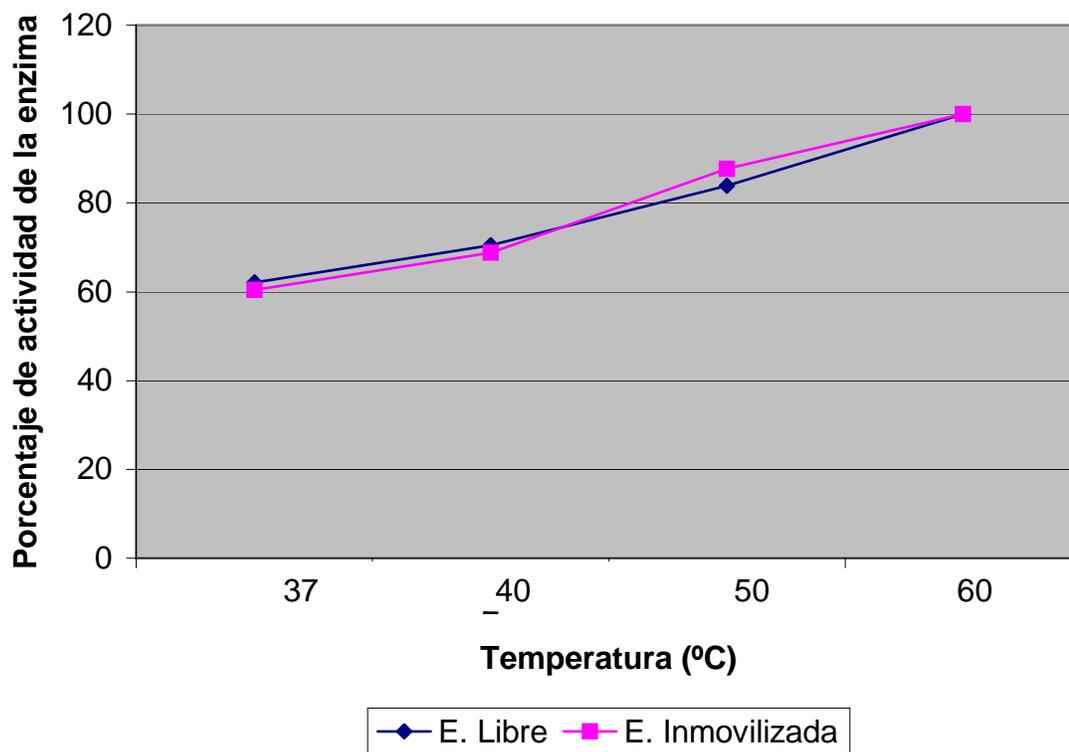


Figura 12. Gráfico de Porcentaje de Actividad de Enzima Libre e Inmovilizada frente a los cambios de Temperatura (pH 7.0)

Según la tabla 8 y figura 12, muestra que, tanto la enzima libre como inmovilizada, actúan en un 100% de su actividad, a una temperatura de 60°C.

Para la enzima libre e inmovilizada el aumento de temperatura es gradual a partir de los 37°C.

## 5.2 PREFORMULACIÓN DE PREPARADOS DE ENZIMA LIBRE AL 1.0, 3.0, Y 5.0.% Y DE ENZIMA INMOVILIZADA AL 10.0 %.

Teniendo en cuenta que estos preparados serían aplicados en la piel y que ésta presenta un pH de 6.0, el vehículo que contendría la enzima debería de presentar un pH de 6.0. Por lo tanto coincide con el pH óptimo que la enzima presenta en su estado libre según el Método Modificado de Kunitz (pH de 6.0), siendo el vehículo la solución buffer fosfato pH 6.0.

En el caso de los preparados de enzima inmovilizada al 10% que también serían aplicados a la piel, el medio para mantener las bandas de enzima y así evitar que estas perdieran su humedad debería presentar el mismo pH en el que la enzima actúa en su 100% (pH 7.0) siendo este, buffer fosfato pH 7.0.

Por tal razón no fue necesario modificar el pH del buffer.

## 5.3 APLICACIÓN DE PREPARADOS TÓPICOS DE ENZIMA LIBRE E INMOVILIZADA.

Para la aplicación de los preparados tópicos de enzima libre al 1.0, 3.0 y 5.0% y bandas de enzima inmovilizada al 10% en agar – agar se desarrollo en un período de un mes, a doce pacientes ambulatorios seleccionados al azar con previo consentimiento, se desarrolló según numeral 4.9.

La temperatura óptima a la cual se debió aplicar los preparados, basándose los datos obtenidos en el método modificado de Kunitz era de 60°C, pero dicha

temperatura era demasiado alta para ser aplicados en la piel, por lo que se optó por aplicarlos a temperatura ambiente.

#### 5.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO PROTEOLÍTICO DE LA ENZIMA PAPAÍNA

Para la evaluación de las cicatrices se tomaron en cuenta principalmente los cambios que surgieron después del tratamiento en parámetros largo, ancho, grosor, además se evaluó el aspecto estético de cada cicatriz como su color y forma. (Ver tabla 9, pág. 78)

Tabla 9. Cambios de Cicatrices por Aplicación de Preparados Tópicos de Enzima Libre e Inmovilizada. (Ver Anexo 15 Y 16)

Paciente	Concentración (%)	Tipo de cicatriz	Edad de la cicatriz	Parámetros antes del tratamiento (cm)			Parámetros después del tratamiento (cm)			Observaciones
				L	A	G	L	A	G	
1	1.0	Queloides	10 años	8.4	1.4	0.1	8.4	1.3	0.0	Aclaración de color y semirugosa
2	1.0	Queloides	11 años	1.9	2.0	0.1	1.9	2.0	0.0	Cambio a forma irregular plana
3	1.0	Queloides	3 meses	0.8	0.3	---	0.7	0.2	---	Cambio a forma ovalada plana
4	3.0	Queloides	2 años	4.0	1.0	0.3	4.0	0.8	0.2	Cambio a una forma irregular con partes aplanadas.
5	3.0	Queloides	8 años	9.0	1.4	0.1	9.0	1.2	0.0	Cambio a forma plana sin rugosidades
6	3.0	Estrías	7 meses	6.0	1.5	---	5.9	1.3	---	Cambio a forma irregular cerrada
7	5.0	Queloides	7 años	10.	1.3	0.1	9.7	1.2	0.1	Desaparición de algunos puntos de sutura
8	5.0	Estrías	3 años	3.5	0.1	0.1	1.2	0.0	0.0	Disminución de la visibilidad, forma plana
9	5.0	Queloides	10 años	2.5	3.1	0.2	1.8	2.7	0.1	Disminución de la rugosidad de la piel
10	10.0	Queloides	7 meses	0.6	0.3	0.2	0.5	0.2	0.0	Color rojo, forma ovalada lisa.
11	10.0	Queloides	9 años	6.5	0.5	0.1	5.2	0.3	0.0	Pequeñas áreas con rugosidad
12	10.0	Queloides	8 años	1.0	0.7	---	0.8	0.6	---	Circular lisa

L: Largo A: Ancho G: Grosor ----: No presenta grosor

CAPITULO VI  
ANÁLISIS DE RESULTADOS

## 6. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

- En la determinación de la Actividad Proteolítica de la Enzima Papaína: pH y Temperatura Óptima.

Las enzimas son compuestos de naturaleza proteica las cuales pueden ser desnaturalizadas por diferentes factores, entre ellos los más importantes, son la temperatura y el pH. En la aplicación de enzimas no hay establecidos parámetros fijos de estos factores, que brinden la información necesaria para obtener un máximo de actividad, por lo que fué necesario determinar el pH y temperatura óptima a la cual actúa en un cien por ciento.

- En la tabla 3 se presentan los valores de actividad enzimática en unidades Kunitz tanto de enzima libre como inmovilizada, para cada uno de los pH ensayados transformando dichos valores a términos de porcentaje para una mejor comprensión como se muestra en la tabla 4 y figura 10 , en la que se verifica un 100% de actividad enzimática a un pH de 6.0 para la enzima libre y a un pH de 7.0 para la enzima inmovilizada .

- En la determinación de la temperatura óptima a un pH constante de 6.0 los valores de actividad en unidades Kunitz para enzima libre e inmovilizada a diferentes temperaturas se muestra en la tabla 5, la tabla 6 y figura 11 en

términos de porcentaje verificando un 100% de actividad enzimática a una temperatura de 60 °C.

- En la figura 11 se observa que la actividad de la enzima libre aumenta desde una temperatura de 37°C, en cambio la inmovilizada su aumento lo realiza desde una temperatura aproximada de 40°C por lo que se puede determinar como el inmovilizado afecta a la actividad de la enzima, protegiéndola de los cambios externos.

- En la determinación de la temperatura óptima a un pH constante de 7.0, los valores de actividad en unidades Kunitz de enzima libre e inmovilizada a diferentes temperaturas, se muestran en la tabla 7, y en términos de porcentaje en la tabla 8 y figura 12 obteniendo un 100% de actividad tanto para enzima libre como inmovilizada a una temperatura de 60°C, al igual que para un pH de 6.0, la diferencia es en el comportamiento de la enzima inmovilizada, que muestra un aumento de actividad a una temperatura de 37°C , al igual que la enzima libre manteniendo un incremento similar hasta alcanzar el cien por ciento de actividad. Demostrando así como varia el comportamiento de la enzima inmovilizada a este pH (7.0).

- Evaluación del Efecto Proteolítico en Cicatrices de tipo Queloides y Estrías, por medio de la Aplicación de Preparados Tópicos de Enzima Libre al 1.0, 3.0 y 5.0% y de Enzima Inmovilizada al 10.0%. (Ver Tabla 9)

- Los pacientes tratados con preparados tópicos al 1.0%, presentan una disminución de 0.1 cm en los parámetros grosor y ancho en paciente 1, no así en paciente 2 que solo disminuyó 0.1 cm en su grosor, para paciente 3 la disminución de parámetros en largo y ancho fue de 0.1 cm

- Los pacientes tratados con preparados tópicos al 3.0%, se observa un cambio en el grosor de 0.1 cm. y 0.2 cm en ancho para el paciente 4, en cambio para paciente 5 disminuye 0.2 cm. en ancho y 0.1 cm en grosor, para él paciente 6 disminuye 0.1 cm. en largo y 0.2 cm en ancho.

- Los pacientes tratados con solución al 5.0%, se observa en paciente 7 una disminución 0.3 cm en largo y 0.1 cm en ancho; paciente 8 disminuyó en largo 1.3 cm. y 0.1 cm. en ancho y grosor, paciente 9 registra un disminución de 0.7 cm en el largo, 0.4 cm en ancho y 0.1 cm en su grosor.

- Los pacientes tratados con bandas de papaína inmovilizada en concentración al 10.0%, presentan, en paciente 10 muestra una disminución de 0.1 cm en largo, ancho y grosor, paciente 11 disminuyó en largo 1.3 cm en ancho 0.2 cm y grosor 0.1 cm, en paciente 12 disminuyó 0.2 cm. en el largo y 0.1 cm en ancho.

CAPITULO VII  
CONCLUSIONES

## 7. CONCLUSIONES

1. El pH óptimo de actividad de enzima papaína en estado libre es de 6.0 y el de la inmovilizada es igual a 7.0.
2. Tanto la enzima libre como la inmovilizada presentan una gran actividad al ser expuestas a altas temperaturas, mostrando su actividad óptima a 60°C.
3. El comportamiento de la enzima libre e inmovilizada depende más del pH del medio, que de la temperatura sobre la cual actúan.
4. La aplicación de la enzima papaína en cicatrices no produce efecto indeseable debido a que es un tratamiento natural y a la vez que su pH óptimo de acción en solución (pH 6.0), se encuentra dentro del rango de pH que presenta la piel. (Ver Anexo 16)
5. En los pacientes tratados con solución de enzima libre al 1.0%, la acción mostrada fue lenta, sus efectos no fueron tan notorios presentando leve disminución en parámetros medidos y algunos cambios de color de la piel.

(Ver Anexo 16)

6. Los pacientes tratados con solución de enzima libre al 3.0% sus efectos aparecen en un período de 3 semanas aproximadamente, ocurre una disminución más evidente en los parámetros medidos.
7. En pacientes tratados con solución al 5.0% los resultados se presentaron con mayor rapidez, aproximadamente 2 semanas y al finalizar el tratamiento los cambios son evidentes en las cicatrices, disminución considerable en el largo, ancho y grosor.
8. Los pacientes tratados con bandas de enzima inmovilizada, presentaron al finalizar el período de tratamiento una disminución leve en parámetros largo, ancho y grosor.
9. La enzima libre presenta una mayor acción que la enzima inmovilizada, por encontrarse en su pH óptimo, ya que la piel presenta un rango de pH de 6.0 a 6.5 y además existe mayor superficie de contacto.
10. De los 2 estados libre e inmovilizada, la que presentó resultados más marcados fue la enzima libre, porque la inmovilizada tiene poca superficie de contacto sobre el substrato (cicatriz), por ser un sólido y ésta tiende a actuar mejor en substratos líquidos, ya que estos penetran hasta los lugares donde se encuentra la enzima atrapada.

11. En los pacientes 7, 8 y 9 se puede verificar que independientemente de la edad de la cicatriz siempre se pueden obtener resultados significativos en el cambio de los parámetros medidos (Largo, ancho y grosor), aunque es de tener en cuenta que la concentración del preparado es importante y que ésta da resultados más satisfactorios si es del 5.0%.
  
12. Verificándose de manera visual por medio de fotografías se ha comprobado que la enzima papaína mejora estéticamente las cicatrices de tipo queloides y estrías.
  
13. Los preparados de papaína libre actúan con mayor rapidez en estrías que en queloides. (Ver Anexo 16)

CAPITULO VIII  
RECOMENDACIONES

## 8. RECOMENDACIONES

1. En base a los resultados obtenidos en la fase clínica y por ser este estudio un ensayo preliminar, es necesario para estudios posteriores aumentar el tiempo del tratamiento y el número de pacientes, para obtener resultados más significativos.
2. Realizar ensayos aumentando la temperatura de los preparados antes de ser aplicados, hasta una temperatura soportable para el paciente.
3. Realizar ensayos con enzima extraída de obtención natural del látex del fruto de *Carica papaya*, ya que en la presente investigación se utilizó enzima purificada refinada.
4. La enzima papaína tiene diversas aplicaciones por lo que se deben realizar estudios basados en la industria cosmética y farmacéutica.
5. Debido al comportamiento que presentó la enzima inmovilizada en gel de agar-agar, es importante realizar ensayos a nivel de laboratorio con otro tipo de soporte que sea flexible, no se corte con facilidad y que siempre sea reutilizable.

6. Realizar estudios a nivel de laboratorio y a nivel industrial acerca de la extracción y purificación de la enzima papaína a partir del látex de **Carica papaya**, para dar lugar a una nueva industria en El Salvador.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Afaq S, Iqbal J. 2001. Immobilization and Stabilization on Chelating Sepharose: a Metal Chelate Regenerable Carrier. Electronic Journal of Biotechnology. Vol.4. No. 3. Universidad Católica de Valparaíso. Chile. Páginas 120 - 124.  
[www.ejbiotechnology.info/content/vol4/issue3/full/1/1.pdf](http://www.ejbiotechnology.info/content/vol4/issue3/full/1/1.pdf)
2. Arroyo M.1998. Inmovilización de Enzimas. Fundamentos, Métodos y Aplicaciones. Universidad Complutense de Madrid. Madrid. España. Páginas 1-16.  
[www.urg.es/~ars/abstract/arroyo.pdf](http://www.urg.es/~ars/abstract/arroyo.pdf)
3. Bungay, H.R. Goel, M.K. 1994. Enzyme Immobilization.  
[www.Cape.Canterbury.ac.nz/Archive/IMMOB/immob.htm](http://www.Cape.Canterbury.ac.nz/Archive/IMMOB/immob.htm)
4. Candido L.C. 2001. Nova Abordagem no Tratamento de Feridas. Editorial SENAC. Sao Paulo. Brasil.  
[www.feridologo.com.br/curpapaina.htm-17k](http://www.feridologo.com.br/curpapaina.htm-17k)
5. Casiano S. 2003. Tratamiento para mejorar la Pigmentación Provenientes de Quemaduras. Saude em Movimento. Universidad de Sao Paulo. Brasil.  
[www.saudeemmovimento.com.br/reportajem/noticiaframe.asp?codnoticia=1...](http://www.saudeemmovimento.com.br/reportajem/noticiaframe.asp?codnoticia=1...)

6. Cuadra Zelaya, T.E. 2000. Normalización de la Enzima papaína Inmovilizada por la Técnica de Atrapamiento en Gel. Universidad de El Salvador. El Salvador. Páginas 27-29, 38-42, 47-50, 98-100
7. Comunidad del Cuero. 2003. Historia de la Piel. Editorial Cueronet. Uruguay.  
[www.cueronet.com](http://www.cueronet.com)
8. Computer Modeling of Papain. 2000.  
[www.colby.edu/chemistry/CH367lab6.pdf](http://www.colby.edu/chemistry/CH367lab6.pdf)
9. Hazoury B. 2002. Centro de Dermatología Clínica y Cirugía. Republica Dominicana.  
[www.cirugiadermatologica.com](http://www.cirugiadermatologica.com)
10. Martín Memorial Health Systems. 2003. Anatomía de la Piel. USA.  
[www.mmhs.com/clinical/adult/spanish/derm/anatomy.htm](http://www.mmhs.com/clinical/adult/spanish/derm/anatomy.htm)
11. Ministerio de Planificación. 1979. Estudio de Factibilidad para una Empresa de Producción de Látex de Papaya y de Papaína Refinada con capacidad de 40 TM. 2 – 10. El Salvador.

12. Newsholme E.A. Leech A.R. 1986. Bioquímica Médica. Primera Edición. Editorial Mc. Graw - Hill. Madrid. España. Páginas 38-51.
13. Seidel, Ball, Danis, G. 1995. Manual Mosby de Exploración física. Tercera Edición. Ediciones Harcourt S.A. Madrid. España. Páginas 137 – 139.
14. Spencer, N. Lipkin, H. 1992. Clinical Pharmacology and Nursing Management. Fourth Edition. J.B. Lippincott Company. Philadelphia. USA. Páginas 1141 - 1143
15. Steven C. Larsen N.2004.  
[www.emboj.org/cgi/content/full/716/13/3787](http://www.emboj.org/cgi/content/full/716/13/3787)
16. Stony Brook. 2004. Linkend-Papain. The collaborative Group, Ltd. Papain. Worthington Biochemical Corporation INC. New York. USA. Páginas 1 – 7.  
[www.collabo.com/linkpap.html](http://www.collabo.com/linkpap.html)
17. Tortora J. Reynolds S. 1998. Principios de Anatomía y Fisiología. Séptima Edición. Editorial Harcourt Brace de España S.A. Madrid. España. Páginas 127 – 130.

18. United Nations Conference on Trade and Development , General Agreement on Tariffs and Trade (UNCTAD/GATT). 1987. La Papaína en El Reino Unido. Ginebra, CH. Centro de Comercio Internacional; Tráchtala, Córás. Páginas 2 – 10.

19. Via Farma.2004. Papaína. Via Farma Importadora Ltda. Sao Paulo. Brasil. Página 17.

[www.viafarmanet.com.br/literaturas-mostra.asp?L=65](http://www.viafarmanet.com.br/literaturas-mostra.asp?L=65)

ANEXOS

## ANEXO 1

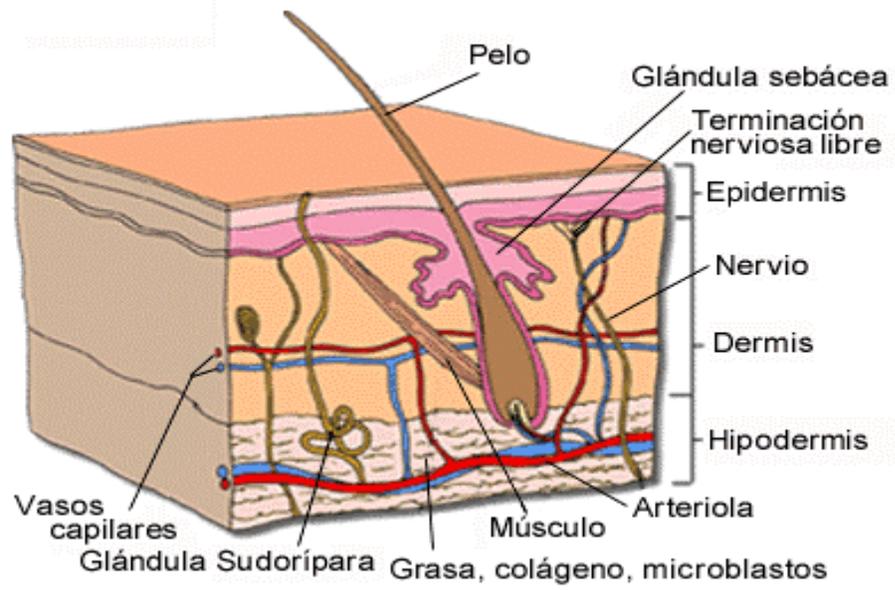


Figura 13. Estructura de la piel

## ANEXO 2

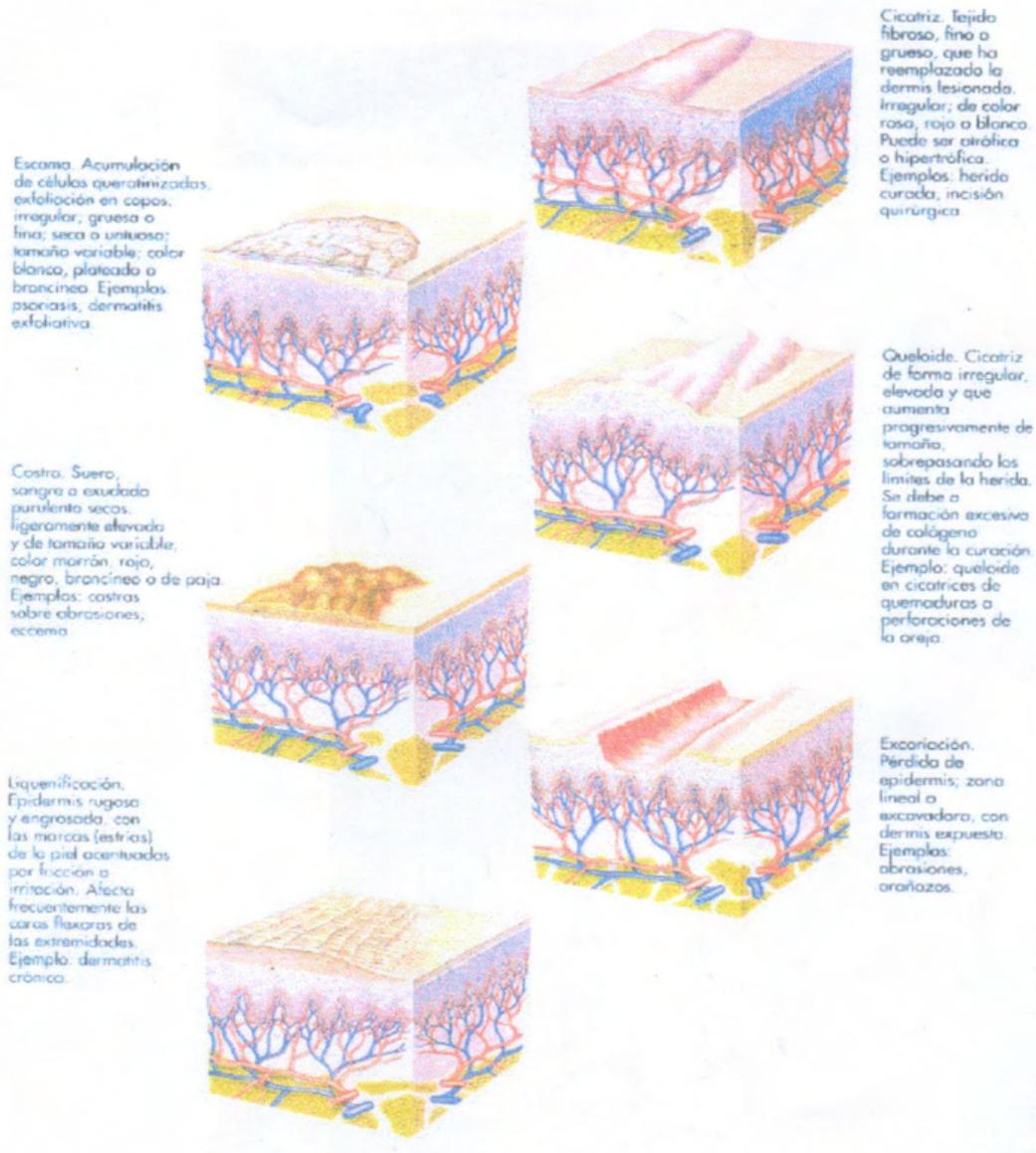


Figura 14. Lesiones cutáneas causadas por traumatismo externo

### ANEXO 3

NH<sub>2</sub>-Ile-Pro-Glu-Tyr-Val-Asp-Trp-Arg-Gln-Lys-Gly-Ala-Val-Thr-Pro-Val-Lys-Asn-Gln-Gly-Ser-Cys-Gly-Ser-Cys-<sup>10</sup>  
<sup>20</sup> |  
 Trp-Ala-Phe-Ser-Ala-Val-Val-Thr-Ile-Glu-Gly-Ile-Ile-Lys-Ile-Arg-Thr-Gly-Asn-Leu-Asn-Gln-Tyr-Ser-Glu-Gln-  
<sup>30</sup> | <sup>40</sup> | <sup>50</sup>  
 Glu-Leu-Leu-Asp-Cys-Asp-Arg-Arg-Ser-Tyr-Gly-Cys-Asn-Gly-Gly-Tyr-Pro-Trp-Ser-Ala-Leu-Gln-Leu-Val-Ala-Gln-  
<sup>60</sup> | <sup>70</sup>  
 Tyr-Gly-Ile-His-Tyr-Arg-Asn-Thr-Pro-Tyr-Tyr-Glu-Gly-Val-Gln-Arg-Tyr-Cys-Arg-Ser-Arg-Glu-Lys-Gly-Pro-Tyr-  
<sup>80</sup> | <sup>90</sup> | <sup>100</sup>  
 Ala-Ala-Lys-Thr-Asp-Gly-Val-Arg-Gln-Val-Gln-Pro-Tyr-Asn-Gln-Gly-Ala-Leu-Leu-Tyr-Ser-Ile-Ala-Asn-Gln-Pro-  
<sup>110</sup> | <sup>120</sup>  
 Val-Ser-Val-Val-Leu-Gln-Ala-Ala-Gly-Lys-Asp-Phe-Gln-Leu-Tyr-Arg-Gly-Gly-Ile-Phe-Val-Gly-Pro-Cys-Gly-Asn-  
<sup>130</sup> | <sup>140</sup> | <sup>150</sup> |  
 Lys-Val-Asp-His-Ala-Val-Ala-Ala-Val-Gly-Tyr-Asn-Pro-Gly-Tyr-Ile-Leu-Ile-Lys-Asn-Ser-Trp-Gly-Thr-Gly-Trp-  
<sup>160</sup> | <sup>170</sup> | <sup>180</sup>  
 Gly-Glu-Asn-Gly-Tyr-Ile-Arg-Ile-Lys-Arg-Gly-Thr-Gly-Asn-Ser-Tyr-Gly-Val-Cys-Gly-Leu-Tyr-Thr-Ser-Ser-Phe-  
<sup>190</sup> | <sup>200</sup>  
<sup>210</sup> |  
 Tyr-Pro-Val-Lys-Asn-COOH

Figura 15. Secuencia de aminoácidos de la enzima papaína

#### ANEXO 4.

Cuadro 1. Equipo, Material y Reactivos para la Determinación Actividad Proteolítica de la Enzima Papaína Libre e Inmovilizada (Determinación de pH y temperatura)

Equipo	Materiales	Reactivos
Baño de agua Scientific Products B7001-3	Vasos de precipitado	Agua endurada artificialmente 30°DH
Estufa Memmert. Tipo U30 110V. 60MHZ	Erlenmeyer	Solución de Fosfato Trisódico 2 g/l
Espectrofotómetro UV-VIS Lambda 12 Perkin Elmer	Agitadores de vidrio	Substrato caseína
Balanza Analítica Mettler Zúrci tipo H15 Cap. 160 g.	Tubos de ensayo	Solución de ácido tricloroacético
	Pipetas Mohr	
pHmetro Mettler Toledo 355 Digital.Ion Analyzer	Espátulas	Agua endurada artificialmente a 15°DH
	Vidrios de reloj	
Hot plate con agitador Magnético modelo 700-5011 Mig-by Barmant Co.	Pipetas Volumétricas	Buffer Fosfato a diferentes pH
	Balones volumétricos	Solución de papaína

## ANEXO 5.

Cuadro 2. Preparación de Reactivos para el Ensayo de la Actividad

REACTIVO	MATERIAL	PROCEDIMIENTO
Agua endureda artificialmente a 30 °DH	0.630g. de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.466g. de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 L. de agua destilada o buffer fosfato del pH requerido.	Disolver el $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y el $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 1 L. de agua destilada o buffer fosfato del pH requerido.
Solución de fosfato trisódico 2 g/L	4.63g de $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 1L. de agua destilada o buffer fosfato del pH requerido.	Disolver el $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ en 1 L. de agua destilada o buffer fosfato del pH requerido
Substrato de Caseína	1.0g de caseína hammarstein solución de fosfato trisódico 2 g/L Agua endureda artificialmente a 30°DH	Disolver la caseína en 50 ml de solución de fosfato trisódico. Ajustar el pH a 9.0 o al pH requerido con ácido cítrico 0.05M o NaOH 0.2N.

°DH: Grados de dureza

Cont... Cuadro 2. Preparación de Reactivos para el Ensayo de la Actividad

REACTIVO	MATERIAL	PROCEDIMIENTO
		<p>Calentar por 15 min. en agua hirviendo, enfriar.</p> <p>Colocar la solución en un balón volumétrico de 100ml.</p> <p>Aforar la solución con el agua endurada artificialmente a 30°DH</p> <p>Ajustar al pH a 9.0 o pH requerido, con ácido cítrico 0.05M o NaOH 0.2N.</p>
<p>Solución de ácido tricloroacético</p>	<p>5.0 g de ácido tricloroacético</p> <p>100.0 ml de agua destilada</p>	<p>Disolver al ácido tricloroacético en una parte del agua destilada cuidadosamente, luego adicionar el restante de agua destilada.</p>

Cont... Cuadro 2. Preparación de Reactivos para el Ensayo de la Actividad

REACTIVO	MATERIAL	PROCEDIMIENTO
Agua endurada artificialmente a 15 °DH	0.315g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.233g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 L. de agua destilada o buffer fosfato del pH requerido.	Disolver $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y el $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 1 L. de agua destilada o buffer fosfato del pH requerido.
Solución de fosfato trisódico 2 g/L en agua endurada artificialmente a 15 °DH	9.26g de $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 1 L. de agua destilada o buffer fosfato del pH requerido.	Disolver $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ en 1 L. de agua endurada artificialmente a 15 °DH ajustar el pH a 9.0 o pH requerido con ácido cítrico 0.05M o NaOH 0.2N.
Solución de papaína	0.015 g de papaína Solución de fosfato trisódico 2 g/L en agua endurada artificialmente a 15°DH ajustada a pH 9.0 o requerido.	Disolver la papaína en Solución de fosfato trisódico 2 g/L en agua endurada artificialmente a 15°DH colocar en un balón de 50 ml, aforar con la solución

## ANEXO 6.

Cuadro 3. Preparación de Buffer Fosfato a pH 6.0, 7.0, 7.5.

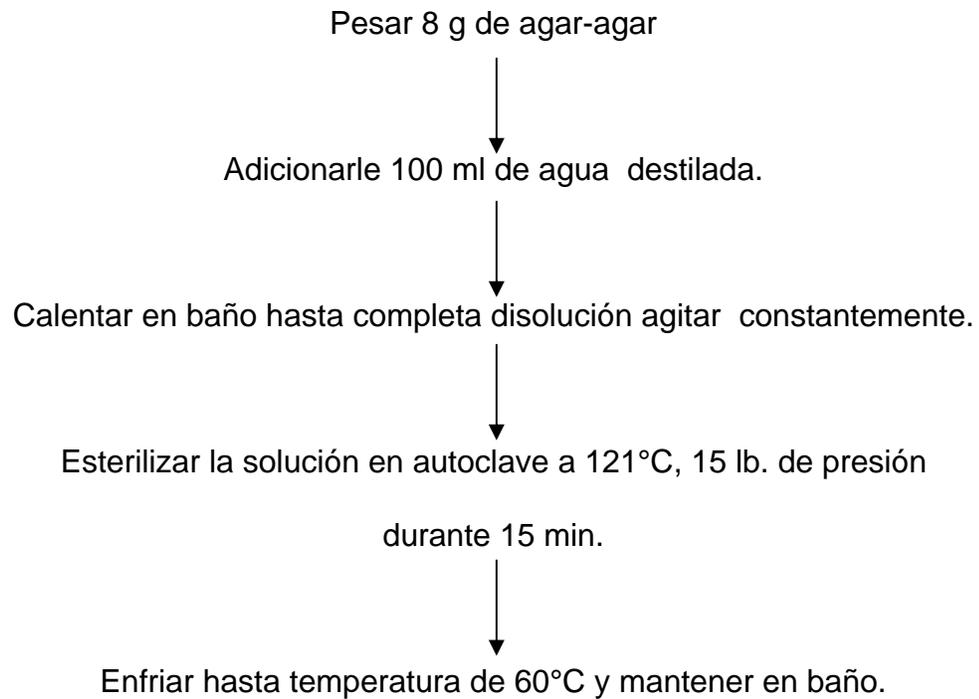
REACTIVO	MATERIAL	PROCEDIMIENTO
Fosfato de potasio monobásico 0.2 M	23.22 g de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ Agua libre de $\text{CO}_2$	Disolver el $\text{KH}_2\text{PO}_4$ en agua libre de $\text{CO}_2$ y aforar a 1,000 ml
Buffer Fosfato pH 6.0	50.0 ml de fosfato de potasio monobásico 0.2M. 5.6 mL de NaOH 0.2N Agua libre de $\text{CO}_2$	Colocar la solución de fosfato de potasio monobásico 0.2M en un balón volumétrico de 200 mL agregar el NaOH indicado y aforar con agua libre de $\text{CO}_2$ .
Buffer fosfato pH 7.0	50.0 ml de fosfato de potasio monobásico 0.2M. 29.1mL de NaOH 0.2N Agua libre de $\text{CO}_2$	Colocar la solución de fosfato de potasio monobásico 0.2M en un balón volumétrico de 200 mL agregar el NaOH indicado y aforar con agua libre de $\text{CO}_2$ .

Cont.... Cuadro 3. Preparación de Buffer Fosfato a pH 6.0, 7.0, 7.5.

REACTIVO	MATERIAL	PROCEDIMIENTO
Buffer fosfato pH 7.5	50.0 ml de fosfato de potasio monobásico 0.2M. 40.7mL de NaOH 0.2N Agua libre de CO <sub>2</sub>	Colocar la solución de fosfato de potasio monobásico 0.2M en un balón volumétrico de 200 mL agregar el NaOH indicado y aforar con agua libre de CO <sub>2</sub> .

## ANEXO 7.

### PREPARACIÓN DE AGAR – AGAR



## ANEXO 8.

### DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE ENZIMA INMOVILIZADA EQUIVALENTE A 1 ml DE SOLUCIÓN DE ENZIMA PAPAÍNA.

#### PROCEDIMIENTO.

1. Pesar 100 mg de enzima papaína
2. Mezclar la enzima con 25.0 ml de Agar-Agar a 47°C
3. Agitar, manteniendo en baño maria.

#### POR LO TANTO:

a) 50.0 ml Agua ----- 0.015 g de enzima

1.0 ml Agua ----- X

$$X = 0.003 \text{ g de enzima}$$

b) 25.0 ml Agar-Agar ----- 0.1 g de enzima

X ----- 0.003 g de enzima

$$X = 0.075 \text{ g de Agar-Agar}$$

Cantidad pesada de mezcla enzima / agar-agar es de 0.075 g conteniendo 0.003 g de enzima y que a la vez es equivalente a 1 ml de solución de enzima.

## ANEXO 9.

### DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD EN UNIDADES KUNITZ.

- La actividad del material enzimático en unidades por gramo se obtiene de la ecuación:

$$\text{Actividad} = \frac{E_{15} - E_0}{C} \times 10^4 \quad (\text{Para la enzima en solución})$$

Donde:

C: Es la concentración de la solución enzimático original en mg/ml

E<sub>15</sub>: Absorbancia después de 15 min. de reacción

E<sub>0</sub>: Absorbancia inicial

$$\text{Actividad} = \frac{I_{15} - I_0}{C} \times 10^4 \quad (\text{enzima inmovilizada})$$

Donde:

C: Es el peso de enzima soluble presente en el peso de enzima inmovilizada pesada.

I<sub>15</sub>: Absorbancia después de 15 min. de reacción.

I<sub>0</sub>: Absorbancia inicial.

Tabla 10. Absorbancias de Enzima Libre e Inmovilizada leídas a 280 nm. en Espectrofotómetro UV-VIS a 40°C y diferentes pH.

pH	E <sub>15</sub>	E <sub>0</sub>	I <sub>15</sub>	I <sub>0</sub>
6.0	0.997	0.223	0.244	0.156
7.0	0.898	0.326	0.553	0.323
7.5	0.788	0.427	0.267	0.098
9.0	0.622	0.311	0.579	0.566

Tabla 11. Absorbancias de Enzima Libre e Inmovilizada leídas a 280 nm. en Espectrofotómetro UV-VIS. A Diferentes Temperaturas.(pH 6.0)

Temperatura (°C)	E <sub>15</sub>	E <sub>0</sub>	I <sub>15</sub>	I <sub>0</sub>
37	0.492	0.098	0.256	0.173
40	0.997	0.223	0.244	0.156
50	0.998	0.123	0.264	0.108
60	1.008	0.004	0.764	0.559

Tabla 12. Absorbancias de Enzima Libre e Inmovilizada leídas a 280 nm. en Espectrofotómetro UV-VIS. A Diferentes Temperaturas.(pH 7.0)

Temperatura (°C)	E <sub>15</sub>	E <sub>0</sub>	I <sub>15</sub>	I <sub>0</sub>
37	0.743	0.239	0.564	0.362
40	0.898	0.326	0.553	0.323
50	0.854	0.174	0.323	0.030
60	0.869	0.058	0.693	0.359

Ejemplo con valores obtenidos a pH 6.0:

$$E_{15} = 0.997$$

$$E_0 = 0.223$$

$$C = 0.3 \text{ mg / ml}$$

$$\text{Actividad} = \frac{0.997 - 0.223}{0.3} \times 10^4$$

$$\text{Actividad} = 2.580 \times 10^4 \text{ Unidades Kunitz}$$

- Determinación del porcentaje:

a) Identificar valor más alto resultante de la actividad en unidades Kunitz, considerándose como valor equivalente al 100 %.

b) Realizar regla de tres para determinar el porcentaje de los siguientes valores.

$$V_{\text{mayor}} \text{ ----- } 100 \%$$

$$V(x) \text{ ----- } ? \%$$

V (x) : Valores menores que el 100 %.

Ejemplo:

$$2.580 \times 10^4 \text{ ----- } 100 \%$$

$$1.096 \times 10^4 \text{ ----- } X$$

$$X = 73.87 \%$$

## ANEXO 10.

### FOTOGRAFÍAS DE TRABAJO DESARROLLADO EN EL LABORATORIO



Figura 19. Preparación de reactivos



Figura 20. Pesadas de enzima  
inmovilizada



Figura 21. Introducción de enzima inmovilizada  
en los tubos respectivos



Figura 22. Introducción de tubos de ensayo en baño maría



Figura 23.



Figura 24.

Figura 23 y 24. Introducción de los tubos de ensayo en incubadora.



Figura 25. Procedimiento de pesadas para preparados de enzima libre.

## ANEXO 11.



Figura 26. Fotografía de la introducción de bandas en frasco con buffer fosfato pH 7

## ANEXO 12.

### FOTOGRAFÍAS DE APLICACIÓN DE LAS SOLUCIONES Y LAS BANDAS



Figura 27. Aplicación de solución de enzima sobre la mano



Figura 28. Aplicación de bandas de enzima inmovilizada sobre la rodilla



Figura 29. Aplicación de bandas de enzima inmovilizada sobre rodilla.

### ANEXO 13.

#### FOTOGRAFÍAS DE MEDICIÓN DE PARÁMETROS



Figura 30. Fotografía de medición de parámetros de queloides

#### **ANEXO 14.**

##### **CARTA COMPROMISO FIRMADA POR CADA UNO DE LOS PACIENTES**

Yo \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ años de edad, por medio de la presente autorizo a las señoritas: Fátima del Rosario Bermúdez Molina y Rosibel Guadalupe Lipe Sanabria, que puedan aplicar los preparados tópicos que ellas han elaborado, sobre la lesión cutánea que presento \_\_\_\_\_ desde hace \_\_\_\_\_ años, a causa de \_\_\_\_\_ y que ellas puedan verificar la actividad proteolítica de la enzima Papaína sobre cicatrices de tipo Queloides y Estrías, tema específico de su trabajo de graduación.

Por lo tanto me comprometo a someterme a su tratamiento, sin ningún problema y que estoy del conocimiento que puedan surgir efectos secundarios aún no específicos de dicho tratamiento.

\_\_\_\_\_

Firma del paciente

## ANEXO 15.

CAMBIOS DE CICATRICES POR APLICACIÓN DE PREPARADOS TÓPICOS DE ENZIMA LIBRE E INMOVILIZADA.

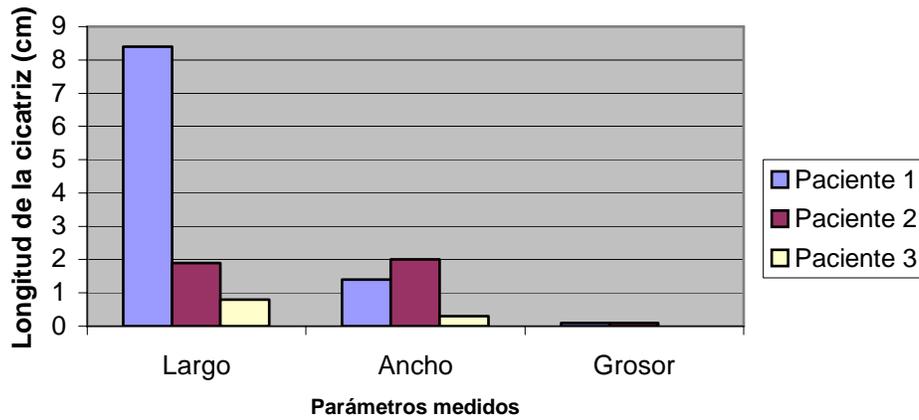


Figura 31. Gráfico de parámetros de pacientes antes de ser sometidos a tratamiento con solución al 1.0%

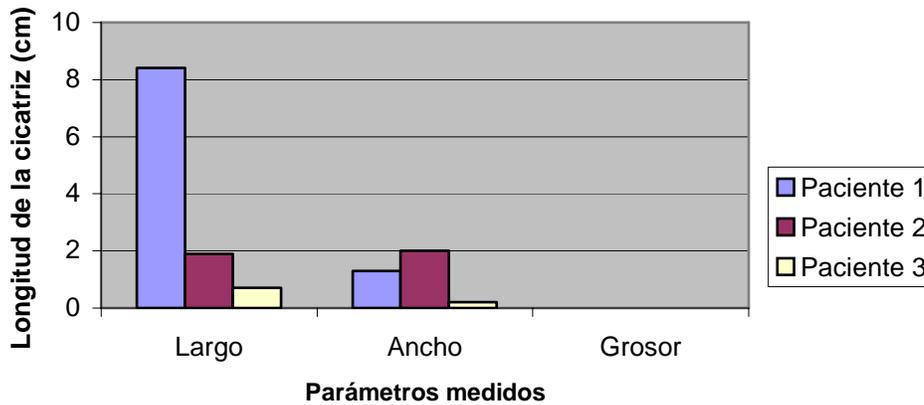


FIGURA 32. Gráfico de parámetros de pacientes después de ser sometidos a tratamiento con solución al 1.0%

CAMBIOS DE CICATRICES POR APLICACIÓN DE PREPARADOS TÓPICOS DE ENZIMA LIBRE E INMOVILIZADA.

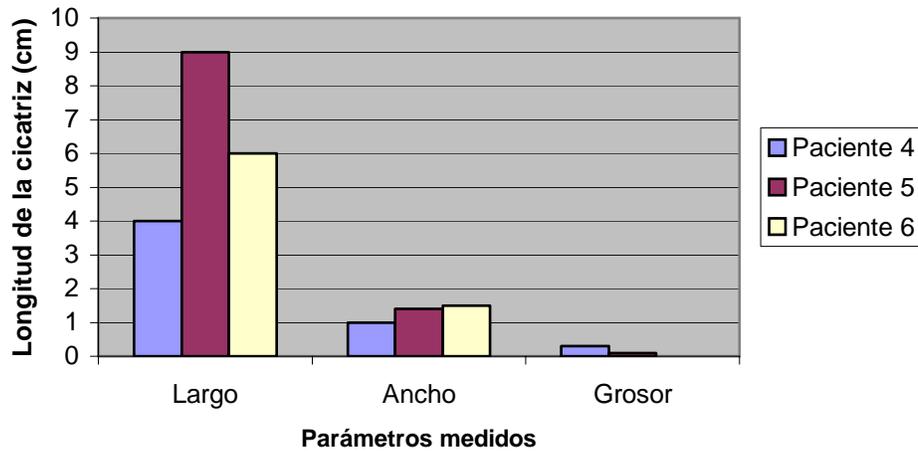


Figura 33. Gráfico de parámetros de pacientes antes de ser sometidos a tratamiento con solución al 3.0%

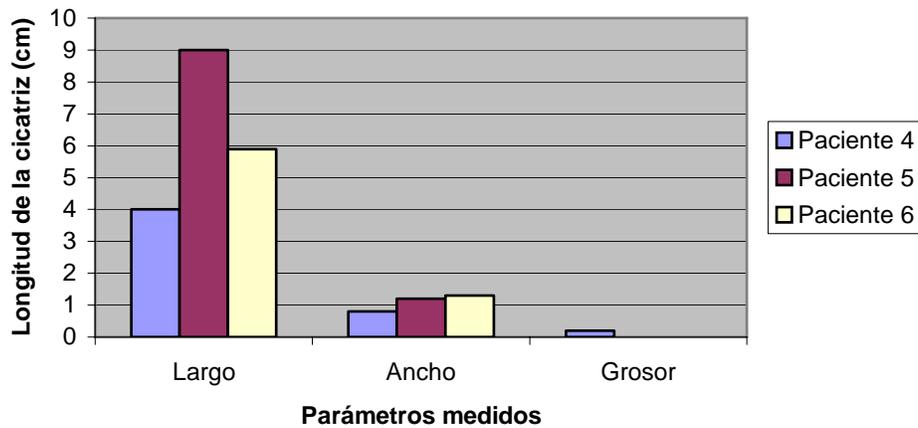


Figura 34. Gráfico de parámetros de pacientes después de ser sometidos a tratamiento con solución al 3.0%

CAMBIOS DE CICATRICES POR APLICACIÓN DE PREPARADOS TÓPICOS DE ENZIMA LIBRE E INMOVILIZADA.

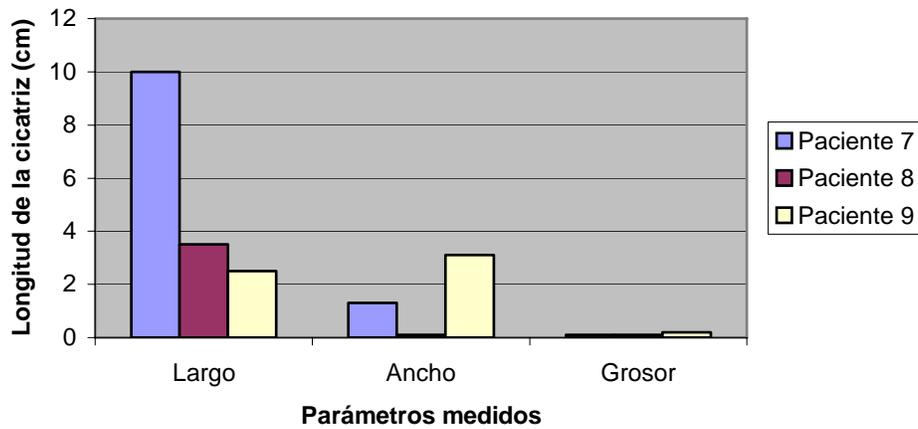


Figura 35. Gráfico de parámetros de pacientes antes de ser sometidos a tratamiento con solución al 5.0%

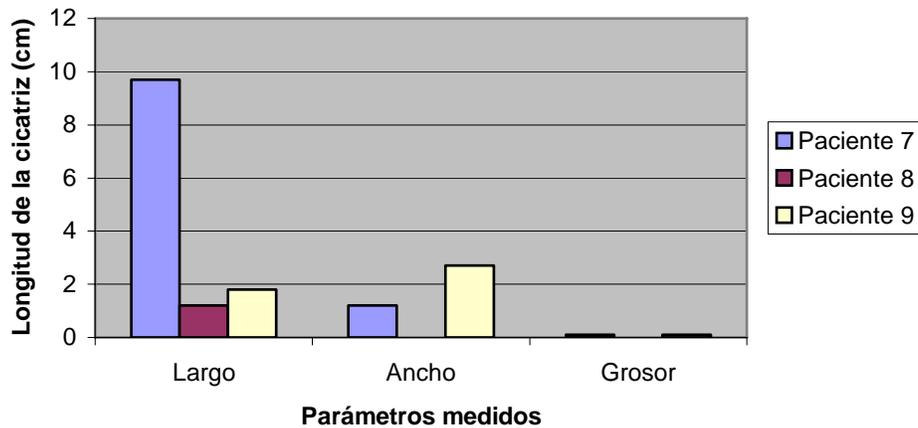


Figura 36. Gráfico de parámetros de pacientes después de ser sometidos a tratamiento con solución al 5.0%

CAMBIOS DE CICATRICES POR APLICACIÓN DE PREPARADOS TÓPICOS DE ENZIMA LIBRE E INMOVILIZADA.

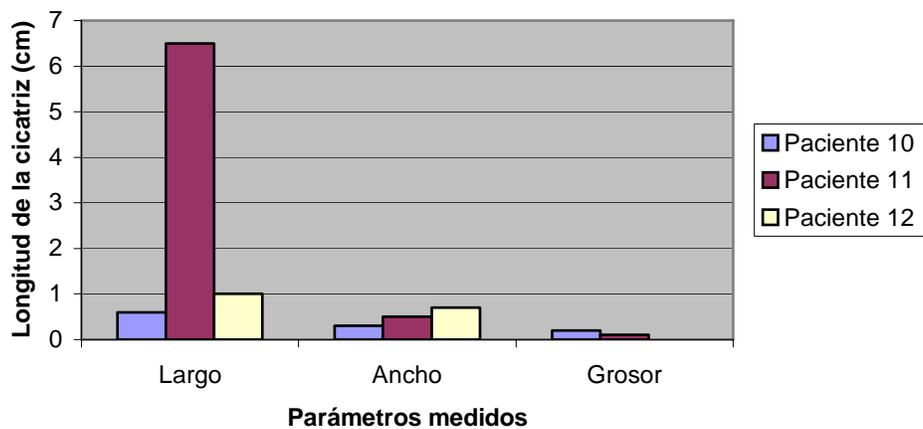


Figura 37. Gráfico de parámetros de pacientes antes de ser sometidos a tratamiento con bandas al 10.0%

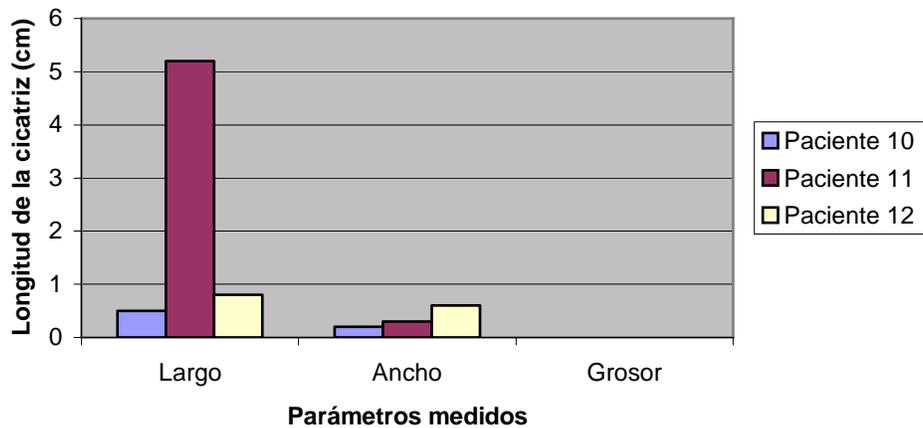


Figura 38. Gráfico de parámetros de pacientes después de ser sometidos a tratamiento con bandas al 10.0%

## ANEXO 16

FOTOGRAFÍAS DE LOS PACIENTES SOMETIDOS AL TRATAMIENTO.



Figura 39. Muestra el queloide situado en el abdomen de paciente 1 antes del tratamiento.

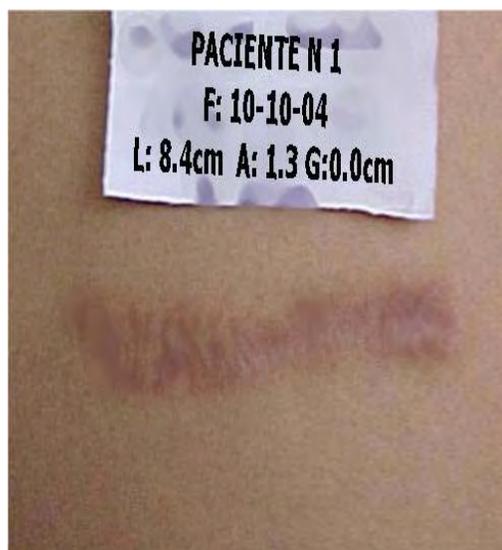


Figura 40. Muestra el queloide situado en el abdomen de paciente 1 después del tratamiento

## FOTOGRAFÍAS DE LOS PACIENTES SOMETIDOS AL TRATAMIENTO.



Figura 41. Muestra el queloide situado en la muñeca de la mano de paciente 2 antes del tratamiento



Figura 42. Muestra el queloide situado en la muñeca de la mano de paciente 2 después del tratamiento

## FOTOGRAFÍAS DE LOS PACIENTES SOMETIDOS AL TRATAMIENTO.



Figura 43. Muestra el queloide  
situado en la mano de  
paciente 3 antes del  
tratamiento



Figura 44. Muestra el queloide  
situado en la mano de  
paciente 3 después del  
tratamiento

## FOTOGRAFÍAS DE LOS PACIENTES SOMETIDOS AL TRATAMIENTO.



Figura 45. Muestra el queloide situado en el brazo de paciente 4 antes del tratamiento



Figura 46. Muestra el queloide situado en el brazo de paciente 4 después del tratamiento

## FOTOGRAFÍAS DE LOS PACIENTES SOMETIDOS AL TRATAMIENTO.



Figura 47. Muestra el queloide situado en el abdomen de paciente 5 antes del tratamiento



Figura 48. Muestra el queloide situado en el abdomen de paciente 5 después del tratamiento

## FOTOGRAFÍAS DE LOS PACIENTES SOMETIDOS AL TRATAMIENTO.



Figura 49. Muestra las estrías situadas en el abdomen de paciente 6 antes del tratamiento

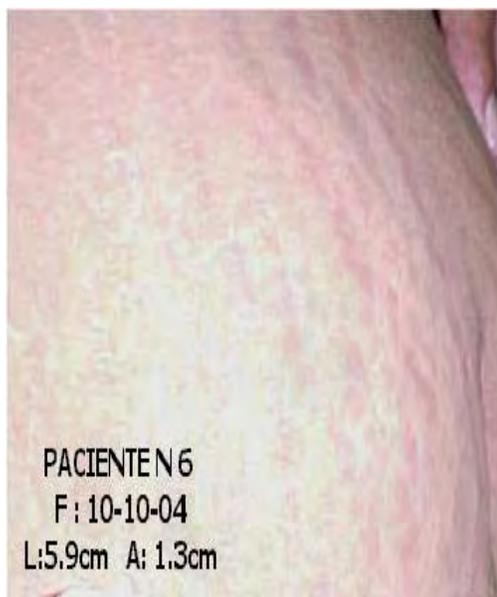


Figura 50. Muestra las estrías situadas en el abdomen paciente 6 después del tratamiento

FOTOGRAFÍAS DE LOS PACIENTES SOMETIDOS AL TRATAMIENTO.



Figura 51. Muestra el queloide situado en el abdomen de paciente 7 antes del tratamiento



Figura 52. Muestra el queloide situado en el abdomen de paciente 7 después del tratamiento

FOTOGRAFÍAS DE LOS PACIENTES SOMETIDOS AL TRATAMIENTO.



Figura 53. Muestra las estrías situadas en la cadera de paciente 8 antes del tratamiento

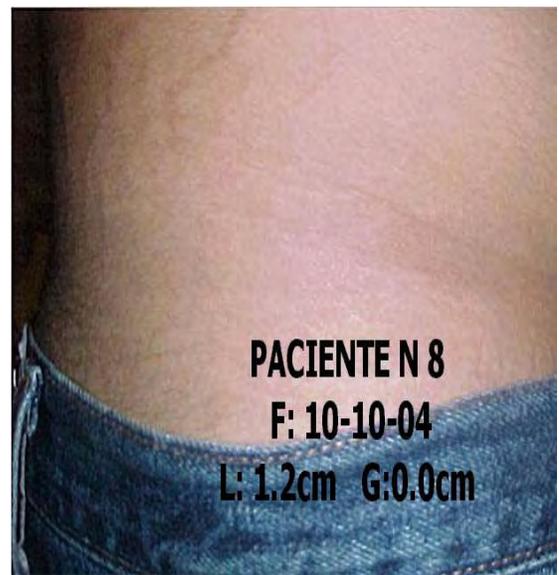


Figura 54. Muestra las estrías situadas en la cadera de paciente 8 después del tratamiento

FOTOGRAFÍAS DE LOS PACIENTES SOMETIDOS AL TRATAMIENTO.



Figura 55. Muestra el queloide situado en la muñeca de la mano de paciente 9 antes del tratamiento

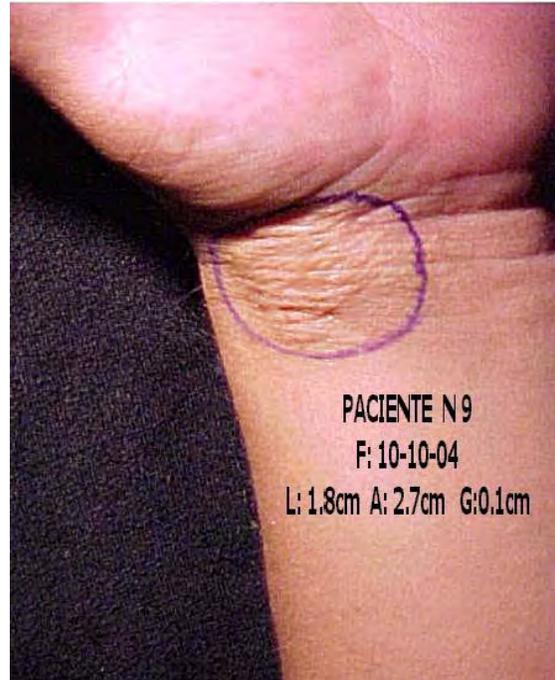


Figura 56. Muestra el queloide situado en la muñeca de la mano de paciente 9 después del tratamiento

FOTOGRAFÍAS DE LOS PACIENTES SOMETIDOS AL TRATAMIENTO.



Figura 57. Muestra el queloide situado en la rodilla de paciente 10 antes del tratamiento



Figura 58. Muestra el queloide situado en la rodilla de paciente 10 después del tratamiento

FOTOGRAFÍAS DE LOS PACIENTES SOMETIDOS AL TRATAMIENTO.



Figura 59. Muestra el queloide situado en la rodilla de paciente 11 antes del tratamiento



Figura 60. Muestra el queloide situado en la rodilla de paciente 11 después del tratamiento

FOTOGRAFÍAS DE LOS PACIENTES SOMETIDOS AL TRATAMIENTO.



Figura 61. Muestra el queloides situado en el brazo de paciente 12 antes del tratamiento



Figura 62. Muestra el queloides situado en el brazo de paciente 12 después del tratamiento