

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotechnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotechnológica



**COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE PURIFICACIÓN DE LA
PAPAÍNA, UTILIZADAS EN DIFERENTES INDUSTRIAS. AREQUIPA,
2022**

Tesis presentada por la bachillera
Cornejo Castro, Daniela Alejandra
Para optar el Título Profesional de
Ingeniera Biotechnológica

Asesor:
Ing. Alvarado Quiroz, Keny Davi

Arequipa – Perú
2023

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
INGENIERIA BIOTECNOLOGICA
TITULACIÓN CON TESIS
DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 13 de Abril del 2023

Dictamen: 005477-C-EPIB-2023

Visto el borrador del expediente 005477, presentado por:

2017205372 - CORNEJO CASTRO DANIELA ALEJANDRA

Titulado:

**COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE PURIFICACIÓN DE LA PAPAÍNA, UTILIZADAS EN
DIFERENTES INDUSTRIAS**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

**29389056 - PAZ ALIAGA CARLOS EITEL IVAN
DICTAMINADOR**



**29440909 - MOLINA RODRIGUEZ FREDY NICOLAS
DICTAMINADOR**

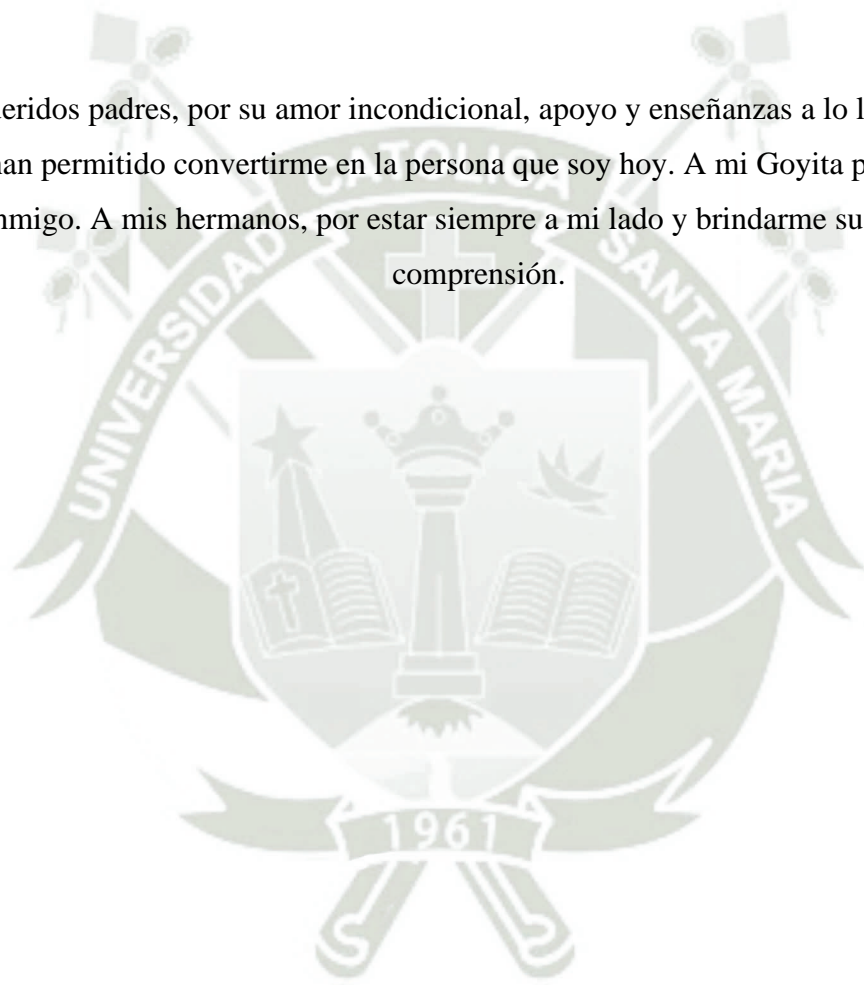


**43679772 - LOPEZ ALVAREZ NATALIA PAOLA
DICTAMINADOR**



DEDICATORIA

A mis queridos padres, por su amor incondicional, apoyo y enseñanzas a lo largo de mi vida, que me han permitido convertirme en la persona que soy hoy. A mi Goyita por siempre estar conmigo. A mis hermanos, por estar siempre a mi lado y brindarme su amistad y comprensión.



AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a mi asesor de tesis, por su valiosa guía, apoyo y paciencia durante todo el proceso de investigación y redacción de este trabajo. Su experiencia y conocimientos han sido fundamentales para el desarrollo y éxito de esta tesis.

También agradezco a los miembros del comité evaluador, por sus valiosos comentarios y sugerencias, que me han permitido mejorar y enriquecer este trabajo.

No puedo dejar de agradecer al personal administrativo quienes con su trabajo y disposición hicieron posible que este proyecto se llevara a cabo.

Por último, pero no menos importante, agradezco a todos aquellos que, de una manera u otra, han formado parte de mi vida académica y personal, y han contribuido a que este sueño se haga realidad.

Gracias a todos, desde el fondo de mi corazón.

RESUMEN

En el campo de la Biotecnología, se han llevado a cabo numerosas investigaciones centradas en el estudio del fruto de la papaya. Esta fruta tropical goza de una gran demanda a nivel mundial debido a sus propiedades nutritivas y delicioso sabor. Sin embargo, las propiedades de sus enzimas, especialmente la papaína, han permitido que la papaya se posicione y expanda progresivamente como materia prima en distintos sectores industriales y comerciales.

El látex de la papaya es la fuente principal para extraer la enzima papaína, y existen diversos procesos y métodos de extracción que pueden utilizarse. Cada uno de estos métodos presenta características y propiedades diferenciales, lo que abre un abanico de posibilidades para su uso industrial. A medida que se profundice en el estudio de estas propiedades, se podrán descubrir nuevas aplicaciones y expandir aún más el campo de investigación. De hecho, a lo largo de los años, este campo de estudio ha experimentado un crecimiento sostenido.

La enzima papaína es altamente apreciada en diversas industrias, como la alimentaria, farmacéutica y cosmética. En la industria alimentaria, la papaína se utiliza como ablandador de carnes y en la producción de alimentos procesados, ya que es capaz de descomponer las proteínas y facilitar la digestión. En la industria farmacéutica, la papaína se emplea en medicamentos que tratan trastornos digestivos y en la fabricación de productos antiinflamatorios y cicatrizantes. Por otro lado, en la industria cosmética, esta enzima se utiliza en la elaboración de productos exfoliantes y tratamientos para el cuidado de la piel.

Palabras clave: Comparativa de métodos de extracción, Concentración de papaína, purificación de papaína.

ABSTRACT

In the field of Biotechnology, numerous investigations have been carried out focused on the study of the papaya fruit. This tropical fruit is in great demand worldwide due to its nutritional properties and delicious flavor. However, the properties of its enzymes, especially papain, have allowed papaya to position itself and progressively expand as a raw material in different industrial and commercial sectors.

Papaya latex is the primary source for extracting the papain enzyme, and there are various processes and extraction methods that can be used. Each of these methods presents differential characteristics and properties, which opens up a range of possibilities for industrial use. As the study of these properties deepens, new applications may be discovered and the field of research further expanded. In fact, over the years, this field of study has experienced sustained growth.

The papain enzyme is highly appreciated in various industries, such as food, pharmaceuticals and cosmetics. In the food industry, papain is used as a meat tenderizer and in the production of processed foods, since it is capable of breaking down proteins and facilitating digestion. In the pharmaceutical industry, papain is used in medicines that treat digestive disorders and in the manufacture of anti-inflammatory and healing products. On the other hand, in the cosmetics industry, this enzyme is used in the preparation of exfoliating products and skin care treatments.

As biotechnology advances and more research is done around papaya and its enzymes, it is likely that new applications and benefits will be discovered in various industrial and commercial areas. Therefore, the study of papaya and its enzymes, such as papain, represents an opportunity to promote the development of innovative and sustainable products, improving people's quality of life and contributing to economic growth.

Keywords: Comparison of extraction methods, Papain concentration, papain purification.

INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	V
ABSTRACT	VI
INTRODUCCIÓN	1
1. METODOLOGÍA	4
1.1. Selección de descriptores / cadena de búsqueda	4
2. LA EXTRACCION, CONCENTRACION Y PURIFICACION DE LA PAPAYA: METODOS Y PROCESOS APLICADOS	5
2.1. ASPECTOS CONCEPTUALES DE LA CARICA PAPAYA	5
2.1.1. Definiciones	5
2.1.2. Morfología y taxonomía.....	6
2.2. LA PAPAÍNA.....	6
2.2.1. Definiciones y tipos.....	6
2.2.2. Composición química y propiedades físicas.....	7
2.3. PRODUCCIÓN DE LA PAPAINA	8
2.3.1. Métodos de extracción/concentración.....	8
2.3.2. Métodos de purificación.....	12
2.3.3. Método de liofilización del látex.....	18
2.3.4. Cuantificación de Proteína	20
2.3.5. Método de Aislamiento y cristalización de papaína.....	24
2.4. USO INDUSTRIAL DE LA PAPAINA: ALIMENTARIO, FARMACÉUTICO Y COSMÉTICO	32
2.4.1. La papaína y su uso en la industria alimentaria	33
2.4.2. La papaína y su uso en la industria farmacéutica.....	42
2.4.3. La papaína y su uso en la industria cosmética	45
CONCLUSIONES	51
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación botánica	6
Tabla 2: Tipos de papaína	7
Tabla 3: Procesos de secado	9
Tabla 4: Métodos para medir la actividad enzimática.....	13
Tabla 5: Los pasos básicos en una purificación	14
Tabla 6: Tipos de precipitación	15
Tabla 7: Actividad de la enzima papaína liofilizada frente a cambios de pH a temperatura constante de 40 °C	22
Tabla 8: Actividad proteolítica de la enzima papaína liofilizada frente a los cambios de temperatura a pH constante de 5.5.....	23
Tabla 9: Tres curvas de actividad enzimática de la papaína estándar y promedio.....	28
Tabla 10: Actividad enzimática de los extractos de diez papayos diferentes y promedio de estos	29
Tabla 11: Porcentaje de proteína caseína sin enzima	32
Tabla 12: Porcentaje de Proteína Caseína en Suero	32
Tabla 13: Tabla comparación de autores; efecto de la papaína en la producción de productos lácteos	34
Tabla 14: Tabla comparación de autores; uso de la papaína como ablandador de carne.	37
Tabla 15: Tabla comparación de autores; uso de la papaína en la industria farmacéutica (Estudios).....	43
Tabla 16: Procedimiento de producción de crema depilatoria	46
Tabla 17: Procedimiento de producción de crema exfoliante	47
Tabla 18: Procedimiento de producción de gel.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Árbol, fruto y flor de la papaya	5
Figura 2: Gel de electroforesis y transiluminador (BIORAD).....	21
Figura 3: Grafica de los resultados de la actividad enzimática a diferentes pH a temperatura constante de 40° C.....	22
Figura 4: Grafica de los resultados de la actividad enzimática a diferentes temperaturas a pH constante de 5.5.....	23
Figura 5: Tres curvas de actividad enzimática de la papaína estándar y promedio	28
Figura 6: Extracción de látex de diez papayos diferentes y promedio de estos	30
Figura 7: Promedio de actividad enzimática de la papaína estándar y promedio de actividad enzimática de los extractos	31
Figura 8: Proceso tecnológico general del ahumado.....	38

INTRODUCCIÓN

La papaína obtenida de la papaya (*Carica papaya*) tiene gran potencial biotecnológico por sus múltiples aplicaciones en diversas industrias (1).

La presente investigación tuvo como objetivo analizar y proporcionar información comparativa respecto a los métodos de extracción, concentración y purificación de la papaína para las diferentes industrias. La papaína es una enzima proteolítica (2), que es capaz de descomponer las proteínas en péptidos o incluso en aminoácido (3).

A nivel industrial esta enzima tiene un gran potencial al considerarse como seguro por el Código de Regulaciones Federales de Alimentos y Medicamentos de EE. UU; además, según las normas alimentarias de la Organización mundial de la salud (OMS) y la Organización de las naciones unidas para la alimentación y agricultura (ONUAA o FAO, siglas en inglés), lo reconocen como un aditivo alimentario de alto valor en buenas prácticas de fabricación de alimentos (4).

Existen varias metodologías para la purificación de la papaína; sin embargo, no hay estudios comparativos para así determinar las ventajas y desventajas de los distintos métodos (5). Además, la comparación de estos métodos permitirá identificar cual es el más adecuado para las aplicaciones en diferentes ámbitos como el alimentario, farmacéutico y cosmético (6).

En el ámbito de la industria alimentaria, en el año 2008, su comercialización a nivel mundial llegó a ser de 250 millones de dólares (7), la papaína puede modificar la apariencia, textura, valor nutricional, generar aromas y sabores del producto final (8). Un ejemplo es su uso en la elaboración de queso fresco bovino en las cuencas ganaderas de la región Amazonas, reemplazando al cuajo convencional y así se produjeron quesos (9).

Otra área en la que se aplica la papaína es en el tratamiento médico, se ha demostrado que a nivel farmacológico la papaína tiene un efecto positivo en el tratamiento de heridas, después de la amputación quirúrgica acelera el proceso de cicatrización en colas de ratas (10).

Por otro lado, para que realice la proteólisis necesita activadores específicos como la urea, también ayuda a desnaturalizar las proteínas; esta combinación (papaína-urea) es muy efectiva como uso tópico (11). También es efectiva en el tratamiento de heridas por quemaduras, obstrucción del esófago, eliminación de caries. Además de su uso en problemas gastrointestinales de úlceras, favoreciendo la reparación de los tejidos (12),

disminuye el tiempo de la hidrólisis de proteínas permitiendo su uso como suplemento nutricional, ingrediente farmacéutico, potenciador de sabor, además de sus propiedades bioactivas (13).

La papaína se ha utilizado como proteasa en diversas industrias (14), esto se debe principalmente a su estabilidad de temperatura (bajas o altas) y vida media. Para mejorar e incrementar su estabilidad se utilizan: métodos de inmovilización e ingeniería enzimática (15).

En menor proporción la papaína se utiliza en la industria cosmética, aunque su actividad proteolítica puede ser de gran aplicación en la depilación y la exfoliación (16).

Las aplicaciones y uso de la papaína son un ejemplo de múltiple uso a nivel mundial y lo interesante que resultara la investigación en esta línea, permitiendo descubrir las experiencias sistematizadas de los diferentes usos.

La alta demanda mundial de papaína para usos industriales hace necesaria la búsqueda de fuentes alternativas de extracción tradicional del látex de *Carica papaya*. A pesar de la alta recuperación de papaína del material vegetal *Carica papaya* (hasta 53 g de enzima cruda por kg de látex húmedo), esta fuente natural presenta varios inconvenientes. Primero, solo la papaína representa alrededor del 5-8% del total de cisteína proteasas en el látex, lo que implica una estrategia de aislamiento costosa y compleja. Además, la papaína aislada es muy susceptible a la oxidación, por lo que debe conservarse inmediatamente a bajas temperaturas y debe evitarse el contacto directo con el aire. Por último, otra gran desventaja es la dependencia de los cultivos de papaya de factores externos, como clima, suelo, plagas, etc (15).

Todo lo antes mencionado es parte de la industria biotecnológica que busca nuevas técnicas para obtener con menos pasos un biocatalizador de alta calidad.

Desde el punto de vista tecnológico es relevante la evaluación de diferentes métodos de extracción y purificación de la papaína. Y así, identificar los métodos más adecuados para uso en diferentes industrias.

El estudio comparativo de los métodos de purificación de la papaína creara la expectativa del uso de los recursos locales como es el caso de la papaya arequipeña. El desarrollo de la investigación puede orientarse a la creación de una nueva industria, utilizando recursos locales, lo que podría permitir la generación de empleo; además de la producción de enzimas de bajo costo más accesible para las empresas, favorecerá con respecto a la

utilidad de la papaína en diferentes áreas como la alimentaria, cosmética y farmacéutica. Es más, se puede generar beneficios a la población general con productos de origen vegetal natural que favorecen su salud y estética. Así su conocimiento respecto a todo el proceso de elaboración permitirá que se usen estos productos sabiendo el gran beneficio que puede alcanzar y con ello mejorar su calidad de vida ya que exista una mayor la tendencia al consumo de productos más saludables.

Con estudios recientes se usó el método modificado por Monti et al, donde podemos saber que la extracción a partir de la *Carica papaya var. Arequipensis* produce una papaína con un grado de pureza aceptable y una alta actividad enzimática relativa, con la ventaja de ser un método simple, rápido y económico (71), sin implicar el use de altas concentraciones salinas, o sustancias conteniendo tóxicos, o técnicas cromatográficas, obteniéndose por tanto una papaína con una mínima de alteraciones en su actividad enzimática (68).

Ambientalmente la investigación es relevante en la medida de que aportara al conocimiento y difusión de los usos industriales que tiene la enzima papaína; como materia prima, biodegradables que reducen los niveles de contaminación en el mundo. Con la reutilización de la cascara de la papaya se estaría aprovechando un desperdicio y es eco-amigable.

1. METODOLOGÍA

En primer lugar, es menester indicar que el presente proyecto es de tipo no experimental, ya que los datos son obtenidos de revisiones sistemáticas; exclusivamente en la recopilación de información que ya existe y que está bien documentada. Estos pueden ser libros, artículos científicos, revistas, etc. Toda la recopilación se realiza bajo la intención de obtener los antecedentes acerca del tema seleccionado y poder ir profundizando en los datos obtenidos (72).

Los buscadores usados fueron:

- a. Scopus
- b. IEEE Xplore Digital Library
- c. EBSCOhost
- d. Springer
- e. Science Direct
- f. Web of Science
- g. Taylor & Francis

De los cuales destacan Science Direct, Scopus y IEEE Xplore Digital Library.

1.1. Selección de descriptores / cadena de búsqueda

Una vez seleccionadas las bases de datos, se elegirán los descriptores o palabras clave siguientes: “extracción”, “concentración”, “métodos de purificación”, “papaína”, “látex de papaya”, “uso industrial de la papaína”, “papaína industria alimentaria”, “papaína industria farmacéutica”, “papaína industria cosmética”; a partir de las cuales se realizará la búsqueda de información.

Obtenida la información extraída de las fuentes mencionadas se procederá la selección de la información relevante relacionada con las variables y objetivos de la investigación.

Posteriormente se realizarán comparaciones y complementación de la información para ser analizada y sistematizada.

Respecto a los criterios de inclusión y exclusión en la selección de los artículos e información encontrada en el proceso de búsqueda, se seleccionarán

fundamentalmente según los objetivos de la investigación documental; y entre los criterios de inclusión específicos se consideran:

- Materiales bibliográficos y de web grafía.
- Extraídos de bases de datos especializadas, multidisciplinarias y totalmente confiables.
- Sistematicen experiencias sobre las variables de la investigación.

En tanto que se considera como criterios de exclusión:

- Bases de datos no especializadas, inseguras, no confiables
- No sistematizan experiencias sobre las variables de la investigación

2. LA EXTRACCION, CONCENTRACION Y PURIFICACION DE LA PAPAYA: METODOS Y PROCESOS APLICADOS

2.1. ASPECTOS CONCEPTUALES DE LA CARICA PAPAYA

2.1.1. Definiciones

La papaya (*Carica papaya*) pertenece a la familia de la Caricáceas, nativa de Centroamérica (17); inicialmente bajo el nombre de Olocoton, otros nombres comunes son Papayo, mamón, melón papaya, lechosa, melón de árbol o fruta bomba (18).

En la siguiente figura se aprecia el árbol, el fruto y la flor de la papaya.

Figura 1:
Árbol, fruto y flor de la papaya



Fuente: Silva et al (19).

2.1.2. Morfología y taxonomía.

En la siguiente tabla se presenta la clasificación botánica de la papaya.

Tabla 1:
Clasificación botánica

Reino	Plantea
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Parietales
Familia	<i>Caricáceas</i>
Especie	<i>Carica papaya</i>

Fuente: Mundo, Serrano (18).

La papaya es nativa de los Andes Orientales, la cuenca Amazónica y Centroamérica, es una hierba arborescente de crecimiento rápido, de corta vida, su sistema radicular es muy superficial y sus hojas son de color verde oscuras y gruesas, divididas de forma suborbicular en 5-7 lóbulos, irregulares. Sus flores son dioicas, raramente monoica, posee 5 pétalos y 5 sépalos del mismo color. Sus frutos son gratos al paladar, vallas carnosas y lobulosas, que contienen en su interior una pulpa lechosa de color anaranjado, con numerosas semillas negras y globulares (19).

2.2. LA PAPAÍNA

2.2.1. Definiciones y tipos

La papaína (EC 3.4.22.2.) es funcionalmente clasificada como una enzima hidrolasa y proteasa tiolica. Fue la primera enzima reconocida como miembro de una clase de enzimas proteolíticas que necesitan un grupo sulfhídrico libre para desarrollar su actividad. Los principales tipos de papaína que actualmente se venden en el mercado internacional son los siguientes (14).

Tabla 2:
Tipos de papaína

TIPO	CARACTERÍSTICAS
Papaína Cruda	Se obtiene por el secado del látex al sol o en hornos rústicos. Es un producto de baja calidad, baja estabilidad biológica, de vida corta y de una actividad proteolítica relativamente baja, 350 unidades tirosina/mg (aproximadamente), su rendimiento a partir del látex fresco es de un 20% en peso.
Papaína Semirrefinada	Es obtenida por secado del látex bajo condiciones controladas. Su vida es limitada a 6-8 meses, su rendimiento a partir del látex es de un 25% en peso aproximadamente y su actividad proteolítica es más bajo que de la papaína refinada (450-500 unidades tirosina/mg).
Papaína Refinada	Es la papaína más purificada, biológicamente estable y completamente libre de materia extraña, y tiene una actividad proteolítica más alta que las anteriores (800-1000 unidades tirosina/mg y más). El látex sigue un proceso secuente de operaciones (homogenización, clarificación, filtración sobre placas calificantes, concentración, filtración esterilizante y atomización). Usa métodos de obtención es el Bourdart (secado por aspersion al vacío) y el fraccionamiento alcohólico

Fuente: Arango, (19); Chaves et al, (14).

2.2.2. Composición química y propiedades físicas.

Se compone de 212 aminoácidos con un peso molecular de 23,000 Dalton, se encuentran enrollados en dos partes separadas (20); es capaz de hidrolizar proteínas, pequeños péptidos, aminos, ésteres, carbohidratos y grasas (21, 22). La papaína se caracteriza por ser un polvo amorfo, granuloso de color blanco, grisáceo o parduzco; ligeramente higroscópico e insoluble en agua y en la mayoría de los solventes orgánicos (alcohol etílico y metílico). En el látex presenta enzimas proteolíticas (papaína, quimo papaína A), compuesto azufrado (bencilglucosinolato) (23, 24).

En estas propiedades, se deriva la importancia comercial de la papaína es principalmente debido a su fuerte actividad proteolítica lo que ha permitido que la papaína lidere el mercado de proteasas. Respecto a las propiedades físicas, Balls y Lineweaver, describen la papaína cristalina que se presenta en forma de agujas bajo el microscopio. Algunas veces, presenta otra forma de

cristales, laminas largas con caras hexagonales alargadas, menos solubles en agua, y más soluble en alcohol etílico o metílico; puede ser precipitada fácilmente en solución, especialmente a bajas temperaturas (25).

2.3. PRODUCCIÓN DE LA PAPAÍNA

Todos los procesos de extracción y/o purificación de la papaína parten de la extracción del látex; pero según las características que se quiere que tenga el producto, el proceso difiere. Para la obtención de papaína cruda solo es necesario secar el látex (26).

2.3.1. Métodos de extracción/concentración

2.3.1.1. Proceso de extracción/ concentración

Consiste en la selección de frutos verdes de 3 a 4 meses de edad. El estriado consiste en hacer 4 incisiones verticales a cada uno, en la parte inferior, de 3 mM de profundidad aproximadamente empleando una navaja. La operación se repite en intervalos de dos semanas hasta que el flujo de látex disminuya y la fruta deba ser removida del árbol. Con la maduración, la producción del látex y la concentración de enzimas de este disminuye significativamente (26).

El látex se recolecta llevando a un tanque con agitación que permita tener un líquido homogéneo para proceder a una filtración que ayude a eliminar el material ceroso y las impurezas. En el secado se retira la humedad presente en una muestra dando lugar una transferencia de masa entre la muestra y el gas circundante; así en el caso de la papaína, el líquido que se obtiene después de filtrar pasa por un proceso de secado con el fin de darle una mayor estabilidad a la enzima que se encuentra presente en el látex (9).

Algunos de los procesos de secado más utilizados para el látex son:

Tabla 3:
Procesos de secado

PROCESO DE SECADO	DESCRIPCIÓN
Luz solar	Se basa en la radiación de calor de los rayos solares; en un secador o cámara provista de bandejas removibles en donde se deposita la muestra.
Secador	Es una operación de secado directa.
Horno	Este método consiste en una cámara cerrada con bandejas que imparte calor al aire presente dentro de la cámara, el cual puede tener o no una salida al exterior graduable.
Secado al vacío	Consiste en una cámara hermética con bandejas donde una bomba se encarga de generar vacío dentro de la misma
Secado por liofilización	Se utiliza cuando una muestra no puede ser calentada para evitar la pérdida de alguna característica no termoestable.
Secado por aspersión	Conocido también como secado por rociado, pulverización o spray drying. es un proceso continuo que permite conservar la sustancia que es deshidratada, proporcionándole una mejor manipulación, reducción del volumen y larga vida útil. Esta es una operación unitaria que consiste en la pulverización del material líquido concentrado, el cual entra en contacto con una corriente de aire caliente para finalmente transformarlo en un polvo

Fuente: Puig, (9); Áreas, (10); Yugcha et al, (27); Ramírez, Ayala, (28).

2.3.1.1.1. El método de Kimmel y Smith

Es uno de los métodos más usados de extracción de papaína. Este procedimiento comprende una extracción del látex, eliminación del material insoluble en el extracto a un pH = 9, precipitaciones con sulfato de amonio, seguidas de tres recristalizaciones. La papaína pura obtenida por este método contiene tres componentes: papaína activa, papaína no activable, papaína activable (29).

2.3.1.1.2. El método de Puig

La extracción de látex lo realiza con incisiones en frutos inmaduros, el cual tuvo lugar en los cultivos de papaya, logrando este propósito con la ayuda de una escalera metálica; así cada uno de ellos fue lavado usando una toalla de algodón húmeda, lo que permitió retirar el polvo e insectos presentes en la superficie del fruto; para con una cuchilla de acero inoxidable se realizaron las incisiones longitudinales a lo largo del fruto, recogiendo el látex en un recipiente plástico color ámbar a una temperatura de -20°C , el cual contenía NaCl para disminuir la oxidación del látex. Método de extracción/concentración a partir de la trituración, el cual consiste en preparar un jugo de la cáscara de frutos inmaduros provenientes de otros cultivos, se procedió al lavado con agua y pelado con un cuchillo a una profundidad de no más de 1.5 milímetros. Esta cáscara fue triturada en un procesador de alimentos obteniendo una pasta húmeda almacenada en frascos plásticos color ámbar que contenían NaCl a una temperatura aproximada de -20°C (9).

2.3.1.1.3. Método modificado de Kunitz

La Extracción Y Recolección Del Látex se lleva a cabo por medio del estriado de los frutos verdes. El estriado consiste en hacer incisiones longitudinales en la cáscara del fruto; respecto a la profundidad de las incisiones, algunos autores recomiendan que estas no sean mayores de 2 mM. Mientras que otros dan un rango de variabilidad de 2 a 2.5 mM, y algunos opinan que las profundidades de estas pueden ser de hasta 3mm (15).

Debe de cuidarse mucho esto, ya que incisiones profundas podrían causar infecciones, echando a perder el fruto. Se recomienda utilizar materiales no oxidables para la extracción del látex. Así, los incisores deben ser de acero inoxidable, aluminio, madera, hueso, vidrio, o bambú, pero nunca de metal corriente, esto es debido a que la papaína pierde su actividad fácilmente al estar en contacto con metales como el hierro y el cobre. Las hojas de afeitar de acero inoxidable de doble filo han sido utilizadas con éxito para ello (73).

Generalmente el incisor consiste en una vara de madera, a la cual se le prende un trozo de hoja de afeitar o navaja, de un tamaño tal, que vaya de acuerdo con la profundidad deseada de las incisiones (15).

Una vez realizadas las incisiones, el látex fluye, y cae en los recipientes colectores. Estos recipientes deben ser siempre de un material que no desactive la papaína, así pueden usarse de acero inoxidable, porcelana, vidrio, metal esmaltado, plástico, lona, aluminio (73).

El látex que coagula sobre la incisión, luego que ha cesado el flujo, se raspa, con utensilios no corrosivos y se mezcla con el anterior, ya que no existe diferencia en la actividad proteolítica entre la papaína obtenida del látex fluido y del que coagula en la incisión. Luego de ser colectado, este es transportado en recipientes de material adecuado y se somete ya sea a un simple proceso de secado o directamente a un proceso de purificación, dependiendo de su uso final (15).

2.3.1.1.4. Monti1, y otros Brasil

Realizaron la extracción del látex fresco a partir del desarrollo de frutos verdes recolectados directamente de árboles en la región de Araracuara, Estado de São Paulo, Brasil. Se realizaron tres o cuatro incisiones verticales en los frutos con un instrumento afilado de acero inoxidable a una profundidad de 2 a 3 mM El látex que emerge después de la incisión dura solo de 1 a 2 minutos y luego se coagula rápidamente y se puede recolectar en un recipiente de vidrio. Después de la extracción, el látex se utilizó inmediatamente para la purificación de papaína en su estado nativo o almacenado a -8° C protegido bajo una atmósfera de nitrógeno (68).

2.3.1.1.5. Aguirre, E. y Castillo, P. en Ecuador

Extracción del Látex de la fruta a través de la limpieza y desinfección del área de trabajo y los utensilios a utilizar para el proceso de extracción del látex. Selección de los frutos verdes y completamente desarrollados. Lavado de las frutas de Toronches y papayas que van a ser utilizadas para el proceso, secarlas bien con papel toalla para evitar contaminaciones. Pesar las frutas de Toronches y papayas, para

determinar el rendimiento del látex extraído una vez procesado. El fruto puede recibir varias incisiones repetidamente a intervalos de tres a cinco días, hasta que la aparición del látex comience a disminuir; todas las incisiones deben ser hechas verticalmente y no más de 4 sangrías deben hacerse a un fruto al mismo tiempo, de 1 a 2 mm de espesor cada incisión. Y se colocan recipientes bajo las frutas para la recepción del látex y su concentración. Estos pueden ser de diferentes materiales o formas (23).

2.3.1.1.6. Monzón, R. y Chocano, A

Como método para la obtención del látex, en la extracción se cortó el peciolo de la hoja de la planta *Carica papaya*. Se realizaron cortes de este en pedazos de aproximadamente 2 centímetros. Luego se introdujeron en la prensa de laboratorio y se ejerció presión de 15000 libras, se repitió el procedimiento cinco veces hasta obtener el extracto. El extracto recolectado se pasó a un beaker de 1000 mL previamente lavado con agua potable y jabón y luego con agua destilada. Se le adicionó sulfato de amonio 1M para provocar la precipitación de compuestos que no sean papaína y se almacena en una refrigeradora a 4°C para una mejor conservación durante 48 horas (15).

2.3.2. Métodos de purificación.

Los métodos usados en la purificación de la papaína o purificación de proteínas son diversas y su elección depende básicamente del grado de purificación que se desee alcanzar, el presupuesto disponible y obviamente de las características de la proteína a purificar tales como peso molecular, carga, solubilidad, hidrofobicidad y actividad biológica. Según la fuente de la proteína, esta estará acompañada de diferentes contaminantes, propios del extracto madre. Actualmente hay tres tipos de comunes de ensayos utilizados para medir la actividad de la papaína (8).

Tabla 4:
Métodos para medir la actividad enzimática

Métodos para medir la actividad enzimática	Descripción
Hidrólisis de moléculas de bajo peso molecular de sustratos sintéticos	Estos métodos son los más exactos, más caros y menos pertinentes para aplicaciones prácticas.
Hidrólisis de sustratos proteínicos	Existe una gran variedad de estos métodos debido a tanta combinación de proteínas y metodología a escoger, son los métodos más útiles y confiables siempre que se especifique la naturaleza y fuente de proteína usada, así como las condiciones en que se lleva a cabo el ensayo.
Por habilidad de la enzima para coagular la leche	Estos métodos son los más baratos en términos de materiales, pero no en el tiempo que se toman. Los resultados se expresan en unidades de coagulación de leche, en estos métodos no es importante un dato puntual de absorbancia sino la variación de la absorbancia por unidad de tiempo ocasionada por la actividad de la enzima que se pretende analizar su actividad.

Fuente: Gennaro (24).

2.3.2.1. Método de Kimmel y Smith

La papaína aislada es muy susceptible a la oxidación, por lo que debe conservarse inmediatamente a bajas temperaturas y debe evitarse el contacto directo con el aire. Otra gran desventaja es la dependencia de los cultivos de papaya de factores externos, como como clima, suelo, plagas, etc., lo que evita un suministro continuo de papaína. En general el proceso de purificación de proteínas comprende tres pasos: el fraccionamiento, la purificación (propriadamente dicha) y la limpieza. Los pasos básicos en una purificación se muestran en la tabla siguiente (14).

Tabla 5:
Los pasos básicos en una purificación

ETAPA	OBJETIVOS	OPERACIONES BÁSICAS
Fraccionamiento	Obtener una solución clarificada de la proteína.	Centrifugación Microfiltración
Purificación	Remover contaminantes y concentrar la proteína.	Precipitación salina Cromatografía
Limpieza	Estabilización de la proteína para su almacenamiento, eliminando otras proteínas o proteína degradada.	Cromatografía de exclusión

Fuente Chaves et al, (14).

- El fraccionamiento comprende:

La Filtración: Consiste en pasar el extracto por una barrera porosa en donde las partículas de mayor tamaño son retenidas, dejando en el filtrado aquellas que tienen un tamaño menor al del poro. La fuerza motriz de la operación es la presión. Para la concentración de la proteína en la etapa de purificación de papaína se emplean técnicas de precipitación inducidas por la adición de polímeros o un cambio en el pH, la fuerza iónica de la proteína dado que la solubilidad de esta se determina por la distribución de cargas en la superficie. El precipitado se colecta por filtración o centrifugación; y puede ser (8).

Tabla 6:
Tipos de precipitación

TIPOS	DESCRIPCION
<p>Precipitación por cambio en el PH o precipitación isoelectrica</p>	<p>Consiste en ajustar el pH al punto isoelectrico de la proteína ya que en ese punto las cargas positivas y negativas de la molécula se cancelan, haciendo que no exista repulsión sino atracción ente moléculas formado el precipitado.</p>
<p>Precipitación por incremento en la fuerza iónica o salting out.</p>	<p>Es uno de los métodos más empleados y consiste en la adición de sales que no desnaturalizan la proteína y previenen la contaminación por bacterias. La precipitación ocurre debido a la agregación dado por los grupos hidrofóbicos presentes en la superficie, que quedan expuestos luego de que la sal que ha sido añadida debido a que cada uno de los iones es solvatado por el agua que se encuentra rodeando la proteína</p>
<p>Precipitación por solventes orgánicos.</p>	<p>Similar a la precipitación isoelectrica, la adición de solventes orgánicos, disminuyen la constante dieléctrica de la solución, es decir que la solubilidad de la proteína disminuye y se presente la agregación de moléculas. Se favorece si el pH se encuentra cercano al punto isoelectrico y si la proteína es de bajo peso molecular. Con el fin de evitar que se presente desnaturalización de la proteína se debe realizar a temperaturas inferiores a 0°C, teniendo en cuenta que la temperatura resultante tras la adición de solvente orgánico se incrementa.</p>

Fuente: Bustamante, (8).

- La purificación comprende:

Respecto a la purificación de la papaína como proceso final en la extracción de las proteínas, tiene como objetivo lograr una papaína que se encuentre libre de impurezas y según los objetivos, se encuentre apta para que cumpla la finalidad deseada, por ejemplo, en el ámbito farmacéutico se encuentre apta para la formulación de vacunas y medicamentos. Cabe señalar que una papaína ultra purificada requiere de más operaciones (8).

2.3.2.2. El Método de cristalización de papaína

A partir de látex de papaya fresca que dio rendimientos más altos que los reportados anteriormente. Este método no implica el uso de reactivos de sulfhídrico. La papaína así obtenida es prácticamente pura y presenta una sola banda cuando se somete a electroforesis en gel de poliacrilamida, y es idéntica a la papaína obtenida por otros métodos. La papaína cristalizada por este método, sin el uso de altas concentraciones de sales o sustancias que contengan tiol como la cisteína y el ditiotreitól, se obtiene en forma de un complejo con inhibidores naturales existentes en el látex que pueden eliminarse por diálisis. Por otro lado, en 2014 se informó de un método eficiente de purificación de papaína a gran escala de materia prima de jugo de papaya sin clarificar en un sistema de adsorción por lotes. En este estudio, los autores emplearon una cromatografía de adsorción de lecho expandido de fase inversa (RP-EBAC) utilizando una columna FastlineTM-10-EBAC empaquetada con AmberliteTM-XAD-7HP. Esta permitió a los autores purificar la papaína en una sola operación con un factor de purificación de 149 7.04 y una pureza del 75%. Después del proceso de purificación, la papaína cruda generalmente debe tratarse con agentes reductores para proteger de la oxidación a los grupos tiol de cisteína libres, preservando su actividad proteasa. Cuando sea necesario, los grupos tiol libres de papaína pueden ser regenerados con la adición de tioles de bajo peso molecular, como cisteína o ditiotreitól (30).

2.3.2.3. Método por Cromatografía de Intercambio Iónico

Se basa en que la mayoría de las proteínas tienen cargas en su superficie por lo cual puede tener lugar una interacción entre ellas. En la cromatografía hay una fase móvil y otra estática. Existen de dos tipos, catiónica y aniónica, dependiendo de la carga de la matriz (fase estática). Según sean las cargas de la proteína que se desea separar, la matriz debe tener la carga contraria. Una cromatografía de intercambio catiónico se emplea generalmente para pH inferiores al punto isoeléctrico y lo contrario para una de intercambio aniónico. Es deseable que la carga de la matriz no varíe con un cambio en el pH. La separación tiene lugar, cuando iones presentes en la matriz, son desplazados por la molécula mediante un efecto combinado de interacciones de Van Der Waals y Coulomb. Específicamente este intercambio iónico se realiza en un matriz de Q-Sefarosa, luego de una filtración de la muestra original, compuesta por 0.2 de muestra de látex liofilizado a -40°C en 1 mL de buffer acetato de sodio 50mM de pH 5. Se prepararon muestras de 10 mL en balones aforados, a una concentración de 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 y 0.1 M de NaCl en el mismo buffer. Se instaló montaje con un balón embudo de 100 mL y una columna de 2.5cm de diámetro y 14 cm de altura. En esta columna, se rellenó la matriz hasta alcanzar una altura de 10 cm. Para el arranque se hace una elusión con el buffer. Seguidamente, se sirvió la muestra y se llevaron a cabo eluciones con las soluciones salinas de diferente concentración, recuperando cada una en un vaso de precipitados plástico independiente. Se realizó una prueba de actividad enzimática para cada muestra y aquella en donde se encontraba la actividad fue sometida a liofilización a -40°C para concentrarla. Posteriormente, se re suspendió en 1mL y se sometió a diálisis durante 12 horas haciendo constantemente cambios de buffer externo. Al final de este periodo se aplicó la prueba de Biuret para determinar la cantidad de proteína. Una unidad, hidroliza caseína para producir un color equivalente a $1.0\mu\text{L}$ ($181\mu\text{g}$) de tirosina por minuto a pH 7.5 y 37°C . (color desarrollado por Folin-Ciocalteus). La transformación de μmoles de Tirosina a unidades se da empleando la ecuación (8).

Ecuación 1: Ecuación de la transformación de μ moles de Tirosina a unidades

$$\frac{\text{Unidades}}{\text{ml enzima}} = \frac{(\mu\text{molesTir})(VT)}{(VE)(t)(VC)} =$$

Fuente: Bustamante, (8).

Siendo μ moles Tir, las moles producidas en la reacción, VT el volumen total del ensayo en ml, VE el volumen de la enzima en ml, t el tiempo de reacción en minutos y VC el volumen empleado en la reacción colorimétrica (8).

2.3.3. Método de liofilización del látex

Las papayas fueron recolectadas en el mercado Central de San Salvador. Se seleccionarán 30 papayas verdes plenamente desarrolladas para la extracción del látex. Siguiendo el proceso de Sanitizar el área de trabajo: Limpiar el área con toalla. Agregar texapón y lavar con mascón, posteriormente lavar con agua destilada y, por último, agregar cloruro de benzalconio, dejar actuar por 10 minutos y secar con toalla. Sanitizar las papayas lavándolas con jabón, luego con agua destilada, y dejar secar. Colocar mecheros alrededor del área de trabajo para evitar contaminación. Hacer incisiones en la papaya con un bisturí de acero inoxidable, tener cuidado de no cortar el fruto. Recolectar el látex en un Baker esterilizado, luego trasladar a tubos previamente esterilizados, inmediatamente después colocar en refrigeración a -20°C por un período de 3 días (73).

Para la Liofilización del látex se enciende el aparato liofilizador Telstar Cryodos 6, hasta que la presión llegue a cero; se transportan las muestras congeladas en un recipiente hermético hasta el liofilizador. Se colocan los tubos con el látex congelado dentro de balones de 250 mL y conectar estos a las válvulas del cilindro del condensador del aparato liofilizador, tener cuidado que la presión no baje. Sea abren las válvulas con las que se efectúa el vacío en el interior del recipiente para comenzar la sublimación de la muestra. Dejar en funcionamiento el equipo por un periodo de 6 a 7 horas hasta su total desecación y se almacena la enzima liofilizada en refrigeración en frascos viales previamente esterilizados estas muestras tienen una duración de aproximadamente 3 años (74).

2.3.3.1. Monzón, R. y Chocano, A

Como método para la obtención del látex, en la extracción se cortó el peciolo de la hoja de la planta Carica papaya. Se realizaron cortes de este en pedazos de aproximadamente 2 centímetros. Luego se introdujeron en la prensa de laboratorio y se ejerció presión de 15000 libras, se repitió el procedimiento cinco veces hasta obtener el extracto. El extracto recolectado se pasó a un beaker de 1000 mL previamente lavado con agua potable y jabón y luego con agua destilada. Se le adicionó sulfato de amonio 1M para provocar la precipitación de compuestos que no sean papaína y se almacena en una refrigeradora a 4°C para una mejor conservación durante 48 horas (15).

2.3.3.2. Aguirre, E. y Castillo, P. en Ecuador

Extracción del Látex de la fruta a través de la limpieza y desinfección del área de trabajo y los utensilios a utilizar para el proceso de extracción del látex. Selección de los frutos verdes y completamente desarrollados. Lavado de las frutas de Toronches y papayas que van a ser utilizadas para el proceso, secarlas bien con papel toalla para evitar contaminaciones. Pesar las frutas de Toronches y papayas, para determinar el rendimiento del látex extraído una vez procesado. El fruto puede recibir varias incisiones repetidamente a intervalos de tres a cinco días, hasta que la aparición del látex comience a disminuir; todas las incisiones deben ser hechas verticalmente y no más de 4 sangrías deben hacerse a un fruto al mismo tiempo, de 1 a 2 mm de espesor cada incisión. Y se colocan recipientes bajo las frutas para la recepción del látex y su concentración. Estos pueden ser de diferentes materiales o formas (23).

2.3.4. Cuantificación de Proteína

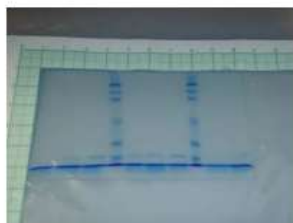
Con el fin de reportar la actividad específica, se hizo necesario encontrar la cantidad de proteína presente en la muestra. Se utilizó el método de Biuret, en el cual se permitió reaccionar 5µL de muestra con 5µL de agua desionizada y 20µL de reactivo de Biuret durante 30 minutos. Luego haciendo uso de un espectrofotómetro (NANODROP), se leyó la absorbancia a 580nM y este valor fue comparado con curva patrón construida con concentraciones conocidas de albúmina. Sabiendo que este método es colorimétrico, no es posible que la muestra a medir tenga algún color, a menos que se conozca su espectro y se corrobore que ningún pico se solapa con los que se espera obtener en la prueba. Es así como la prueba de Biuret solo se aplicó a las muestras provenientes del látex. La transformación de unidades para reportar la actividad específica está dada por la ecuación (9).

Ecuación 2: Ecuación para la transformación de unidades para reportar la actividad específica

$$\frac{\text{Unidades}}{\text{mg proteina}} = \frac{\frac{\text{Unidades}}{\text{ml enzima}}}{\frac{\text{mg proteina}}{\text{ml enzimas}}}$$

Fuente: Bustamante, (8).

El proceso de tinción de cada gel constó de dos pasos. El primero consistió en sumergir el gel en una solución, compuesta por metanol, ácido acético glacial y azul de Coomassie durante una hora media con el fin de fijar las proteínas al gel y teñir las bandas. El segundo en sumergir el gel en una solución compuesta por ácido acético y metanol encargada de desteñir el gel. Usando un transiluminador (BIORAD), fueron tomadas fotos de los geles obtenidos usando luz blanca (9).

Figura 2:**Gel de electroforesis y transiluminador (BIORAD)****Fuente: Bustamante, (8).**

Se concluyó que el látex de los frutos inmaduros es la mejor fuente para la obtención de papaína frente a un extracto de la cáscara. La temperatura de operación no afecta la actividad enzimática obtenida para una muestra sometida a un proceso de secado. Bajo las condiciones evaluadas no existe diferencia estadísticamente significativa entre los valores actividad enzimática específica, reportados en unidades de tirosina / mg de proteína, para las muestras de látex sometidas a los cuatro procesos de secado seleccionados. La especie de la Vega (*Cundinamarca*) tiene una papaína cuyo peso molecular es 22086.79 Da. La actividad enzimática para la papaína cruda es de $7.5 \cdot 10^{-4}$ UT. Las concentraciones ideales para eludir la enzima en un matriz de sefarosa son 0.3 y 0.4 M de NaCl. La actividad enzimática para la papaína cruda es de $1.5 \cdot 10^{-2}$ UT (9).

2.3.4.1. Método modificado de Kunitz.

Para medir la actividad de la enzima papaína se utilizó el método modificado de Kunitz basado en el grado de hidrólisis de los substratos proteicos. Las unidades de actividad (unidades Kunitz) es la actividad en la cual, bajo condiciones descritas, da un incremento en la absorbancia de 0.100. La actividad del material enzimático por gramo se obtiene de la ecuación (15).

Ecuación 3: Ecuación para hallar la actividad de material enzimático por gramo

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

Dónde:

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

E¹⁵: Es la Absorbancia después de 15 minutos de reacción.

E⁰: Absorbancia inicial.

Ensayo de la actividad enzimática en función del pH a temperatura constante de 40 °C (17).

Tabla 7:

Actividad de la enzima papaína liofilizada frente a cambios de pH a temperatura constante de 40 °C

PH DEL SUSTRATO	ACTIVIDAD DE LA ENZIMA PAPAINA LIOFILIZADA (UNIDADES KUNITZ)	ACTIVIDAD DE LA ENZIMA PAPAINA LIOFILIZADA (%)
4.5	2.485*10 ⁴	91.90
5.5	2.704*10 ⁴	100.00
6.0	2.263*10 ⁴	83.69
9.0	0.089*10 ⁴	3.31

Fuente: Fernández et al, (15).

Figura 3:

Gráfica de los resultados de la actividad enzimática a diferentes pH a temperatura constante de 40° C.



Fuente: Fernández et al, (15).

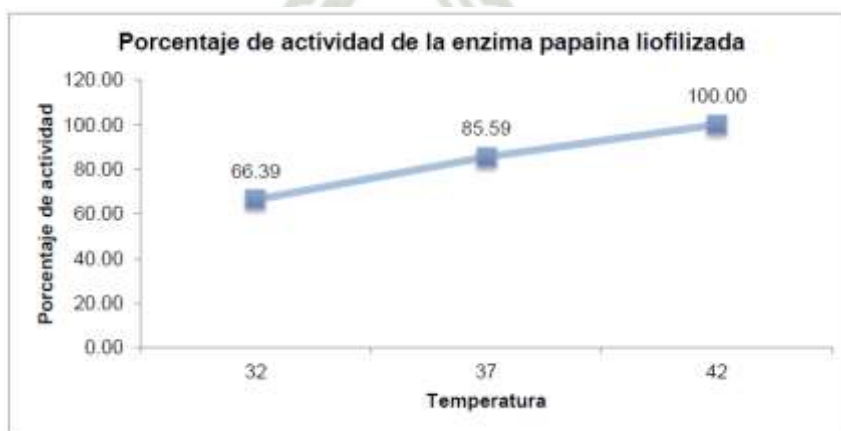
En la tabla se muestran los resultados de la actividad proteolítica de la enzima papaína liofilizada en unidades Kunitz y en porcentaje a diferentes pH y en la figura N° 7 se graficó el porcentaje de actividad proteolítica de la enzima papaína liofilizada a diferentes pH y temperatura constante de 40 °C. Se observa que la enzima papaína liofilizada presenta un máximo de 100% de actividad proteolítica a pH 5.5 y una importante merma a pH alcalino (15).

Tabla 8:
Actividad proteolítica de la enzima papaína liofilizada frente a los cambios de temperatura a pH constante de 5.5.

TEMPERATURA DEL SUSTRATO (°C)	ACTIVIDAD DE LA ENZIMA PAPAINA LIOFILIZADA (UNIDADES KUNITS)	ACTIVIDAD DE LA ENZIMA PAPAINA LIOFILIZADA (%)
32	2.2340*	66.39
37	2.880*	85.59
42	3.365*	100.00

Fuente: Fernández et al, (15).

Figura 4:
Grafica de los resultados de la actividad enzimática a diferentes temperaturas a pH constante de 5.5.



Fuente: Fernández et al, (15).

Se observa que la enzima papaína liofilizada presenta un máximo de 100% de actividad proteolítica a temperatura de 42 °C. Es de destacar que la temperatura corporal promedio humana es de 37 °C. Por lo que al aplicar la enzima liofilizada sobre las cicatrices tipo queloides y verrugas, esta se verá favorecida por la temperatura del entorno para ejercer una importante actividad proteolítica de 85.59%. En este trabajo se mide la actividad de la papaína con el método modificado de Kunitz para la determinación de la actividad proteolítica de la enzima; antes mencionado (15).

Una solución de la enzima es incubada, bajo condiciones estándar con caseína desnaturalizada. La reacción es detenida por la adición de ácido tricloroacético [TCA] (28). La proteína no hidrolizada es precipitada por el TCA añadido. El precipitado es removido por filtración y la absorbancia de la capa sobrenadante es medida espectrofotométricamente a 280 nm. El incremento de la absorbancia a 280 nm, después de la incubación es una medida de la actividad enzimática (9).

2.3.5. Método de Aislamiento y cristalización de papaína

Se utiliza el siguiente procedimiento para obtener papaína en forma cristalina: Para la preparación del extracto, se añadió ácido etilendiaminotetraacético [EDTA], pH 7,0, al látex fresco hasta una concentración final de 1 mM y la preparación se mantuvo bajo nitrógeno durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante. Los posibles volátiles arrastrados por nitrógeno se recogieron cualitativamente mediante burbujeo de agua destilada y se midieron mediante absorbancia en 230 nm. Luego, la suspensión se centrifugó a 12.000 x gramo durante 30 min a temperatura ambiente en una centrífuga Sorvall RC-2B con un rotor SS-34. El sobrenadante (fracción 1) era opalescente y de color amarillo verdoso y el precipitado, que consistía en material insoluble, se descartó. El pH de la fracción 1 se aumentó de 5,4 a 9,0 mediante la adición lenta de hidróxido de sodio 0,1 M con agitación constante y luego se centrifugó a 12.000 x gramo durante 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante transparente (fracción 2) se colocó en el primer recipiente conectado con otro a través de una manguera de silicona. En el segundo matraz se agregaron 30 mL de agua destilada. Al burbujear con nitrógeno en el primer matraz y luego pasar a través de agua destilada, se leyó

una medida de absorbancia en un espectrofotómetro (Ultrospec 1000 Pharmacia). La fracción 2 se colocó en un baño de hielo y se mantuvo en una caja de hielo. Después de 72 h en hielo baño (0°C), la papaína precipitó espontáneamente (1a cristalización) y se recogió por centrifugación a 12.000 x gramo durante 20 min a 0°C (fracción 3). La fracción 3 se lavó tres veces con una cantidad mínima necesaria de EDTA 1 mM, pH 7,0, a 4°C. Luego se recolecta por centrifugación a 12,100 x gramo durante 20 min a 0°C. (fracción 4). La fracción 4 se disolvió en una cantidad mínima necesaria de EDTA 1 mM, pH 7,0, a 37°C durante 30 min en la proporción de 25 mg proteína ml⁻¹ EDTA y luego se coloca en un baño de hielo para precipitación espontánea (1^a recristalización). El precipitado se disolvió en la cantidad mínima necesaria de EDTA 1 mM, pH 7,0 y almacenado a 4°C (fracción 5). Todo el procedimiento se llevó a cabo con burbujeo de nitrógeno para protegerlo del oxígeno atmosférico (9).

La proteína se midió por el método de Itzhaki & Gill 1964 y por absorbancia a 280 nm. La electroforesis no desnaturizante se llevó a cabo por el método de Reisfield et al., 1962 para proteínas básicas, utilizando gel de poliacrilamida al 12%, tampón de β-alanina 34 mM, pH 4,3 y una corriente constante de 4 mA por tubo (75).

2.3.5.1. Método de Cromatografía de látex fresco

Alícuotas de las proteínas disueltas en tampón de acetato de sodio 0,4 M, pH 5,0, se aplicaron a una columna de CM celulosa (1,5 x 20 cm) equilibrada con el mismo tampón. El material se eluyó usando un gradiente discontinuo (0,4 a 1,0 M) de tampón de acetato de sodio, pH 5,0. Los picos obtenidos fueron delimitados, agrupados y se dializó contra EDTA 1 mM a 4°C con tres cambios sucesivos de 10 h cada uno. Después de la diálisis, se liofilizaron y luego se sometieron a electroforesis en geles ácidos. Medida de grupos sulfhidrilo. Los grupos sulfhidrilo se determinaron mediante el método de Ellman. La reacción de papaína con 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) se tamponó con fosfato de sodio 0,1 M, pH 8,0, y se controló espectrofotométricamente a 412 nm, 25°C. Se utilizó el coeficiente de extinción molar de 13.600 para la reacción de DTNB. Cuando se activaron con DTE, las muestras de papaína se separaron del

activador mediante filtración en gel sobre Sephadex G-25 y se e luyeron con tampón de fosfato de sodio 0,1 M, pH 8,0 y EDTA 1 mM en una atmósfera de nitrógeno. Enzimático determinado éster de nitrofenilo (Z-Gly-pNP) por el método de Kirsch & Igelströn, 1966. La reacción se controló a 400 nm y 25°C en tampón fosfato de sodio 0,1 M y EDTA 1 mM, pH 7,0, más acetonitrilo al 6,7% y la fuerza iónica se ajustó a 0,3 M con KCl (31).

Se hicieron correcciones por hidrólisis espontánea. La actividad específica se define como μmol de p-nitrofenol producido por minuto y por mg de proteína en las condiciones anteriores. El coeficiente de extinción molar del p-nitrofenol se calculó como 9.368 M cm^{-1} . La actividad de la papaína también se determinó usando éster etílico de α -N-benzoil-L-arginina (BAEE) como sustrato Davis & Smith, 1955, Jacobsen et al., 1957. La velocidad de hidrólisis se midió mediante titulación a partir de la cantidad de base (Tris 1 M) añadida a la solución no tamponada de enzima y sustrato para mantener un valor de pH dado durante la reacción. Las reacciones se llevaron a cabo en una cubeta termostática a 25°C (30).

Se utilizó un potenciómetro Beckman modelo SS-2 sensible a variaciones de 0,01 unidades de pH y se añadió Tris con una micro jeringa Nimetrics capaz de medir cantidades de hasta $0,1 \mu\text{L}$. La solución se mezcló a fondo mediante agitación constante y se protegió contra el oxígeno molecular atmosférico mediante burbujeo constante de nitrógeno. La velocidad inicial de reacción se calculó directamente a partir de la porción lineal de las curvas para la hidrólisis del sustrato en función del tiempo y la constante catalítica para BAEE se determinó mediante la relación entre La solución se mezcló a fondo mediante agitación constante y se protegió contra el oxígeno molecular atmosférico mediante burbujeo constante de nitrógeno (31).

Concluyó que la en la extracción de látex fresco: El flujo máximo de látex se obtuvo entre las 5:00 y las 10:00 am. Después de la extracción del látex, los frutos que pesan entre 1 y 2 kg maduran y los frutos que pesan entre 200 y 300 g dejan de desarrollarse, muchos de ellos deteriorándose. Las frutas de tamaño mediano que suministran al suelo que pesan entre 0,5 y

1,0 kg son las que contienen las mayores cantidades de látex. Se puede realizar una nueva extracción de látex de 5 a 6 días después, pero se obtienen cantidades menores.

Observamos que para los árboles de papaya que crecen en húmedo, el látex obtenido estaba altamente diluido con bajas concentraciones de papaína. Utilizando un total de 176 frutos obtuvimos 1524 g de látex, con un valor medio de 9 g de látex por fruto.

Cristalización de papaína, electroforesis y filtración en gel. Cuando se burbujea látex fresco con nitrógeno durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante, se libera una sustancia volátil que absorbe luz a 250 nm. Concluye que la papaína aquí preparada tiene las mismas propiedades de la papaína obtenida del método clásico. La cromatografía de látex fresco reveló la presencia de 5 componentes proteicos (30).

2.3.5.2. Monzón, R. y Chocano, A

La separación de la papaína y su conservación, el látex se filtró al vacío, se recogió el sobrenadante y a éste se le adicionó bisulfito de sodio al 1% p/p para la conservación de la papaína.

Para cuantificar esta enzima, se realizó una curva patrón o curva de determinación de la actividad enzimática según la concentración de la papaína versus peso de caseína precipitada. La curva de actividad enzimática resultó útil para conocer el comportamiento de la papaína estándar y que a partir de ella se pueda calcular la actividad enzimática del extracto de los peciolo de la planta *Carica papaya*. Los gramos de caseína precipitada que aparecen en la tabla son el resultado de la acción enzimática de la papaína estándar sobre la caseína presente en la leche. Se realizaron tres curvas de actividad enzimática para tener mayor respaldo estadístico de los datos de los gramos de caseína precipitada (16).

Al final se calculó el promedio de los tres resultados de caseína precipitada por la misma concentración de papaína que se obtuvieron de cada una de las curvas.

Tabla 9:

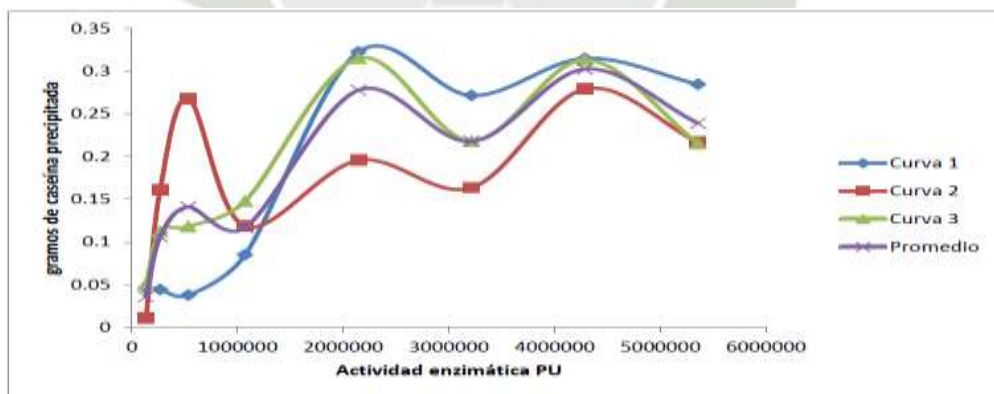
Tres curvas de actividad enzimática de la papaína estándar y promedio

PAPAÍNA ESTÁNDAR (G)	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CONOCIDA (PU/G)	CASEÍNA PRECIPITADA POR LA PAPAÍNA			
		CURVA 1 (G)	CURVA 2 (G)	CURVA 3 (G)	PROMEDIO (G) ± 0.0936
0.0625	134.000	0.0461	0.0106	0.0504	0.0357
0.1250	268.000	0.0441	0.1612	0.1124	0.1059
0.2500	536.000	0.0376	0.2677	0.1181	0.1411
0.5000	1072.000	0.0848	0.1182	0.1479	0.1170
1.0000	2144.000	0.3226	0.1956	0.3152	0.2778
1.5000	3216.000	0.2716	0.1636	0.2182	0.2178
2.0000	4288.000	0.3151	0.2792	0.3134	0.3026
2.5000	5360.000	0.2847	0.2167	0.2153	0.2389

Fuente: Fernández et al, (15).

Figura 5:

Tres curvas de actividad enzimática de la papaína estándar y promedio



Fuente: Fernández et al, (15).

Prueba de confiabilidad: Para la prueba de confiabilidad se obtuvo el extracto del peciolo de las hojas de diez papayos diferentes pertenecientes a la misma plantación y en la siguiente tabla se detallan los datos obtenidos del estudio de la actividad enzimática de cada extracto y el promedio de estos. Los gramos de caseína precipitada se obtuvieron de la reacción entre

la papaína presente en el extracto y la caseína presente en la leche.
Posteriormente se calculó que en 5 mL de extracto hay 1 g de papaína.

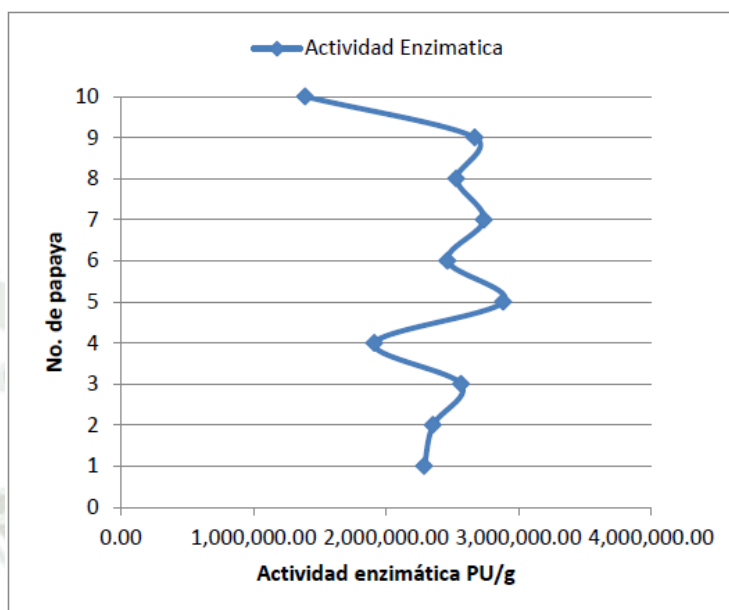
Tabla 10:

Actividad enzimática de los extractos de diez papayos diferentes y promedio de estos

NO. DE EXTRACTO DE PAPAYO	PESO (G) DEL EXTRACTO	CASEÍNA PRECIPITADA (G)	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (PU/G)
1	5.0056	0.3443	2.288.218.23
2	5.022	0.3544	2.355.342.84
3	5.0289	0.3863	2.567.350.28
4	5.0094	0.2879	1.9133.383.76
5	5.0057	0.4342	2.886.693.74
6	5.0224	0.3709	2.465.001.86
7	5.0217	0.4121	2.738.817.11
8	5.0242	0.3808	2.530.797.27
9	5.0073	0.4018	2.670.363.30
10	5.0168	0.2093	1.391.008.06
Promedio		0.3582±0.0044	2.380.591.64±439534.61

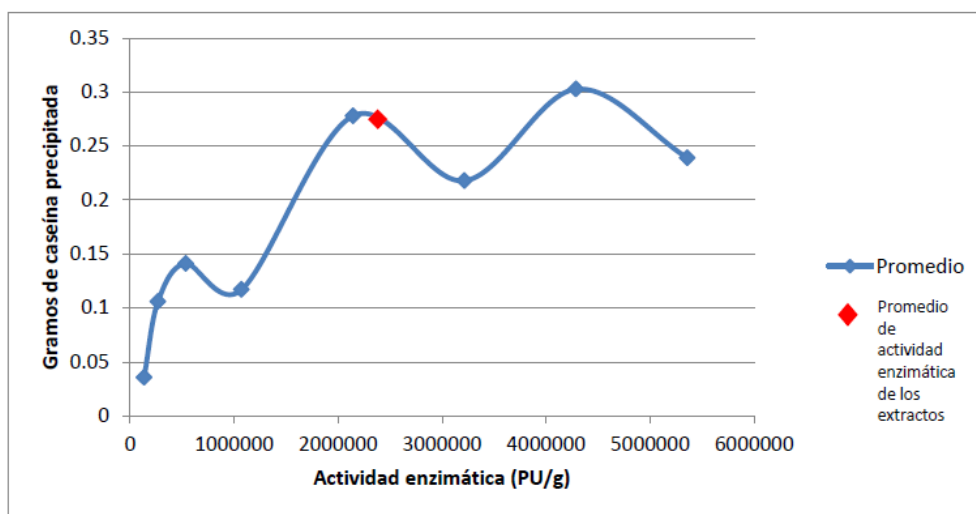
Fuente: Fernández et al, (15).

Figura 6:
Extracción de látex de diez papayos diferentes y promedio de estos



Fuente: Fernández et al, (15).

La presente es una gráfica que demuestra que cada extracto obtenido de los peciols de las hojas de diez papayos diferentes posee actividad enzimática. En el eje X se encuentra la actividad enzimática de los extractos de cada papayo y en el eje Y el número del extracto de cada papayo.

Figura 7:**Promedio de actividad enzimática de la papaína estándar y promedio de actividad enzimática de los extractos**

Fuente: Fernández et al, (15).

En la presente gráfica se compara el promedio de actividad enzimática de los extractos de diez papayos con la curva de actividad enzimática promedio de la papaína estándar. En el eje X se encuentra la actividad enzimática y en el eje Y los gramos de papaína precipitada.

2.3.5.3. Aguirre, E. y Castillo, P

En los análisis de actividad enzimática con el método de coagulación de leche Balls y Hoover, se obtuvo una gama de tiempos de coagulación a las diferentes concentraciones de enzima papaína adicionada a la leche, observando que a medida que aumenta la concentración de papaína diluida en ácido y agregada en la leche el tiempo de coagulación de la leche disminuye en todos los análisis realizados. Para demostrar que la papaína de ambos frutos es activa, se procedió hacer un análisis de determinación de proteínas en leche, con el método de Kjeldahl. Los datos obtenidos en estas pruebas en el laboratorio para la leche, al igual que las pruebas por triplicado del suero proveniente del ácido más cada una de las papaínas se encuentra en las siguientes tablas (23).

Tabla 11:

Porcentaje de proteína caseína sin enzima

Leche	3.789%
Suero (leche + ácido acético)	1.9304%

Fuente: Fernández et al, (15).

Tabla 12:

Porcentaje de Proteína Caseína en Suero

Suero (leche + solución de ácido acético con papaína Papaya)			PROMEDIO
0.718%	0.578%	0.588%	0.6316%
Suero (leche + solución de ácido acético con papaína Toronche)			
0.6869%	0.641%	0.753%	0.6937%

Fuente: Fernández et al, (15).

En la tabla de porcentaje de proteína caseína sin enzima, se puede observar que el % de caseína en la leche es de 3.789%, mientras que al adicionar ácido acético a la leche el % de caseína en el suero es de 1.9304% es decir que la proteína ha disminuido, en comparación con la tabla de porcentaje de proteína caseína en suero, se puede observar que en el análisis por triplicado en el suero producto de la adición de la solución de ácido más papaína a la leche ha disminuido en ambos casos sea papaína de Toronche o papaína de papaya. La enzima no ha reaccionado por completo con la proteína, debido a que la papaína no ha pasado por un proceso de purificación (15).

2.4. USO INDUSTRIAL DE LA PAPAÍNA: ALIMENTARIO, FARMACÉUTICO Y COSMÉTICO

La papaína es una enzima que tiene alta actividad biológica, por lo que es un componente ampliamente usado en la industria farmacéutica y dermatológica, industria alimentaria, aislamiento de células, detergentes, cuero y textiles, cosméticos, etc (32).

Ramírez & Ayala, corroboran al afirmar que: Las enzimas son catalizadores poderosos, manipulables y amigables con el ambiente, en la actualidad y gracias

a los avances en distintos campos de la ciencia se utilizan en diferentes aplicaciones como la industria alimentaria, textil, cosmética, etc. y también en otras áreas que incluyen a la farmacéutica, la de diagnóstico y la química fina (28).

Así, en el desarrollo de esta parte de la investigación se reconoce la importancia de la papaína de la papaya en el desarrollo de la biotecnología; a partir de la explicación y comprobación científica del uso industrial de la papaína y su uso en la industria alimentaria, farmacéutico y cosmético; aunque también es usado en otros ámbitos de la industria.

2.4.1. La papaína y su uso en la industria alimentaria

Para Muñoz, j., Zambrano, M., Párraga, R. y Verduga, C. Las enzimas están involucradas en diversos aspectos de la producción de alimentos. Se pueden agregar a un proceso, pero también pueden ser elaboradas por microorganismos presentes en fermentaciones, lo que da como resultado un alimento con características de composición y sensoriales deseables para su aceptación por el consumidor. Adicionalmente, su utilización para la producción de materias primas en la industria alimentaria es muy relevante (33, 15).

En todo el mundo, la papaína es la proteasa más estudiada y la más utilizada en la industria alimentaria. La papaína se usa para ablandar la proteína de la carne, especialmente de miofibrillas y tejido conectivo. La papaína, una cisteína proteasa de 212 aminoácidos, tiene una fuerte capacidad proteolítica, hidrolizando un tablero de proteínas en pequeños péptidos y aminoácidos. Es ampliamente utilizado en varias industrias, como aplicaciones alimentarias para el ablandamiento de la carne, elaboración de queso, industria cervecera/vinícola, industria panadera, así como para la producción de hidrolizados de proteínas (34).

Entre los principales usos a nivel de la industria alimentaria se mencionan:

2.4.1.1. Industria láctea

Debido a su capacidad para hidrolizar los enlaces peptídicos específicos para generar caseína y macro péptidos, las proteasas se han utilizado ampliamente como biocatalizadores en los procesos de coagulación de la leche en la industria láctea. Uno de los usos más importantes de las

proteasas es la fabricación de queso, demostrándose el potencial de las proteasas vegetales en la elaboración de queso (35).

Tabla 13:

Tabla comparación de autores; efecto de la papaína en la producción de productos lácteos

AUTORES	ESTUDIOS REALIZADOS Y RESULTADOS
<p>Arlene, Prima Kristijarti y Ardelia (36).</p>	<p>Estudiaron el efecto de la papaína en la producción de queso Cheddar con diferentes tipos de leche (vaca, cabra y soja), la papaína presentaba una alta actividad proteolítica en la leche, pero con una coagulación muy irregular. Demostraron que la papaína podría utilizarse como Reemplazo de enzimas de cuajo para la producción de queso duro; presenta ventajas de mejor accesibilidad, menor precio, mayor disponibilidad en grandes cantidades y una mayor resistencia a pH y temperaturas extremas (36).</p>
<p>Mahajan y Chaudhari (37).</p>	<p>Reportan el uso de papaína en la producción de queso semiblando o queso crema (37).</p>
<p>Hejazin y El-Qudah (38).</p>	<p>Mejoró con esta la capacidad de fusión y la capacidad de estiramiento del queso (38).</p>
<p>Abe, Wu, Kim, Fujii y Abe (39).</p>	<p>Desarrolló un nuevo método para la producción de crema de leche de soya utilizando un proceso simple de tres pasos, que incluye digestión con papaína, tratamiento térmico y centrifugación a baja velocidad (39).</p>

Fuente: Elaboración propia

2.4.1.2. Como agente coagulante de la leche

La actividad de coagulación de la leche (ACM) se prepara el sustrato disolviendo leche en polvo descremada bovina comercial en 100 mL de CaCl₂ 10 mM hasta una concentración final del 12% (p/v, pH 6,4). Luego, se preincuban 2 mL del sustrato por 5 min a 37 °C y se agregaron 0,2 mL de la papaína recuperada. Los tubos de ensayo se rotan periódicamente a mano hasta la aparición de partículas discretas visibles. Una unidad de coagulación de la leche se definió como la cantidad de enzima que coagula 10 mL del sustrato en 40 min (2400 s) a 37 °C [13,17]. La temperatura de la leche se varió de 20 a 90 °C; pH de pH 6.5 a 8.5, y la concentración de CaCl₂ de 0 a 50 m (40).



2.4.1.3. Como agente ablandador de carne

El uso de proteasas exógenas para mejorar la ternura de la carne se ha convertido recientemente en un foco de interés creciente. Es una prioridad para la industria cárnica poder cubrir la creciente demanda de carne tierna garantizada y dar valor agregado a los cortes de carne de menor calidad. Muchos enfoques se han basado en mejorar la ternura postmortem, como el ablandamiento mecánico, la mejora del contenido de agua y diferentes tratamientos enzimáticos (41). Tradicionalmente, la carne se ablanda por autoproteolisis (principalmente mediada por catepsinas y papaínas), manteniéndola a 4 °C por 7 a 10 días. En condiciones óptimas de operación (pH alrededor de 7 a 8 y temperatura entre 60° y 65°C) la papaína es capaz de hidrolizar casi cualquier proteína presente en el tejido muscular, así como en los tendones y ligamentos, lo que la convierte en un potente suavizante de la carne (42).

Existen varios estudios en los que se ha evaluado el efecto suavizante de la carne por efecto de la papaína; así, cuando se inyecta la enzima al animal antes de ser sacrificado, permitiendo una distribución homogénea de la papaína en la carne del animal; pero esta técnica causa sufrimiento y estrés en los animales. Una alternativa es la inyección de papaína inactiva. Para este propósito, la papaína generalmente se trata con peróxido de hidrógeno para oxidar la cisteína catalítica y luego se inyecta en el animal. Una vez sacrificado el animal, las condiciones anóxicas inducen la reducción de la cisteína catalítica y con ello la reactivación de la papaína. Sin embargo, este método ante-mortem presenta como inconvenientes predecir el nivel de ablandamiento, debido a factores fisiológicos del animal, diferencias en la textura, sabores u olores no deseados, etc (41).

Tabla 14:

Tabla comparación de autores; uso de la papaína como ablandador de carne.

AUTOR	ESTUDIO REALIZADO	RESULTADOS
Sullivan, y Calkins (43).	Usaron el tratamiento de enzimas de papaína para ablandar carne comparando con el uso de la bromelina, proteasa de jengibre fresco (43).	Los resultados demostraron una mayor capacidad en la papaína para mejorar la sensibilidad en la carne, observada en los cambios de textura (43).
Gil, M., Bedoya, V., Millán, L. y Benavides, Y. Paz (44).	SE filtró el extracto y se concentró para ser aplicado sobre trozos de carne bovina corte posta durante 60s (44).	Se logra como efecto el ablandamiento de la carne, lo que se verificó mediante el análisis de perfil de textura, TPA durante 0min, 5min y 10min (44).
Godoy, J (45).	Se inyectó una solución enzimática del 5% (IE), de forma perpendicular a la dirección de las tiras, en puntos aproximadamente distanciados por 5 mm en los que se inyectó 0.1mL de agua o solución de enzima (45).	Los resultados demuestran que la aplicación de la enzima produce una reducción apreciable de la textura de la carne, especialmente una disminución de la dureza, llegando a ser dicho efecto más perceptible cuando se emplea el método de cocción por horno (45).
Flores, J (46).	Se extrajo 250 ml de látex de Papaya, la cual fue aplicado a la carne de sajino, sometida a diferentes tiempos de inmersión fue evaluada en estado crudo (fresco) y cocido (frito) por panelistas semi entrenados (46).	La concentración de papaína y el tiempo de inmersión de la carne de sajino influyen en el ablandamiento de la carne de sajino; a mayor concentración (25mL/L) y mayor tiempo de inmersión (30 min) se logró un mayor ablandamiento de la carne de sajino tanto crudo como frito (46).

Fuentes: Elaboración propia (47).

2.4.1.4. Ahumado

Según Fuentes et al, el ahumado es una técnica tradicional de tipo culinaria, a través de la cual los alimentos, previamente bañados en salmuera, son sometidos al humo que proviene de un fuego, generalmente de madera que presenta una combustión lenta; es decir es expuesto a efectos de los gases y vapores de partes de plantas incompletamente quemadas realizado con madera con poca resina; cuyo objetivo es preservar los alimentos al combinar los efectos del salado y la

impregnación de los componentes del humo y el secado. Con este proceso se logran tanto las características de sabor y color que son apreciadas por el consumidor, como la apariencia de un producto natural afectado por un mínimo procesamiento y el bajo contenido de sal (47).

Pueden ahumarse los embutidos, quesos, pescado, carnes, salmón, arenque, entre otros, como el pimentón. El humo seca la carne y actúa sobre ella impidiendo su descomposición y proporcionándole un sabor peculiar (48).

Figura 8:
Proceso tecnológico general del ahumado

Recepción de la materia prima	<ul style="list-style-type: none"> • Se reciben las chuletas de cerdo, las mismas que son registradas y sometidas a distintas pruebas para verificar la calidad.
Lavado y pesado	<ul style="list-style-type: none"> • Se lava y se pesa la carne de cerdo para luego ser analizada y realizar los respectivos cortes.
Preparación de la salmuera	<ul style="list-style-type: none"> • Se prepara utilizando 15 % de sal en 250 ml de agua.
Mezclado y sazonado	<ul style="list-style-type: none"> • Se dispone a adobar las chuletas con la salmuera preparada en el paso anterior
Maduración	<ul style="list-style-type: none"> • Se guardan en refrigeración a por un período de 4 horas.
Ahumado	<ul style="list-style-type: none"> • Se lleva al ahumador por 60 minutos
Empacado	<ul style="list-style-type: none"> • Se empaca en platos desechables con una cubierta plástica alrededor para luego ser selladas al vacío
Almacenado	<ul style="list-style-type: none"> • Se almacena a una temperatura de 4°C

Fuente: Muñoz et al, (33).

Muñoz , J., Zambrano, M., Párraga, R. y Verduga, C, elaboraron chuletas de cerdo ahumadas con la aplicación de papaína con resultados positivos según las normas INEN 1217 de calidad se determinó que las propiedades organolépticas de los tratamientos conservan los atributos sensoriales como color, sabor, aroma, suavidad y apariencia general (33).



2.4.1.5. **Industria de la panificación**

El trigo contiene proteínas capaces de provocar reacciones alérgicas en 0,4mi1,3% de niños y 0,2mi0,9% de los adultos. La papaína se ha utilizado para producir harina hipoalérgica adecuada para consumidores alérgicos. Li, Yu, Goktepe y Ahmedna, en el 2016, describieron una eliminación completa de las gliadinas de la harina de trigo mediante un tratamiento enzimático secuencial con alcalasa y papaína. Se encontró que este tratamiento es más efectivo para reducir el contenido de proteínas alérgicas y aumentar la solubilidad en comparación con otras proteasas. Otro problema relacionado con el gluten en la industria de la panificación es que se vuelve insoluble y se expande para formar estructuras reticulares cuando se hidrata. Por lo tanto, se debe hidrolizar el gluten para obtener una masa más moldeable (49).

El uso de proteasas como la papaína mejora la calidad de la masa, evitando que se contraiga, y potenciando su solubilidad, blandura y leudado durante el proceso de horneado (50).

2.4.1.6. **Industria cervecera y vitivinícola**

La papaína es una enzima muy utilizada en la industria cervecera, especialmente en la producción de cervezas ligeras y claras, debido a su alto potencial de resistencia al frío. El tratamiento de la cerveza con papaína (entre otras proteasas) permite la degradación de varios agregados proteicos insolubles formados durante y después de la fermentación de la cerveza, sin efectos secundarios sobre sus propiedades organolépticas. Además, varios estudios publicados han probado el efecto de la papaína como agente estabilizador del vino. debido a la amplia especificidad de sustrato que presenta la papaína (51).

En un estudio reciente, Esti, y otros autores, evaluaron la actividad de la papaína en condiciones similares al vino, lo que demuestra que esta proteasa podría aplicarse de manera eficiente como biocatalizador en la industria del vino ya que la papaína de fruta madura y el látex de papaya mostraron una buena actividad hidrolítica hacia el sustrato Bz-Phe-Val-Arg-pNA al valor de pH mínimo promedio del vino [3.2] a pesar de la

presencia de etanol, tanto en McIlvaine como en tampón tartárico. Sin embargo, la papaína del látex mostró una actividad catalítica significativamente más alta y estable con respecto a la papaína de la fruta y la bromelina del tallo, pronosticando una perspectiva interesante para su aplicación útil en el vino real. Sin embargo, son necesarios más estudios para evaluar el efecto de los inhibidores naturales del vino sobre la actividad proteolítica de la papaína (34).

2.4.1.7. Alimentación animal

Aproximadamente el 90% de la energía alimentaria y los nutrientes para los rumiantes provienen de forrajes de bajo costo. Por lo tanto, la cuantificación de compuestos nitrogenados solubles en el rumen es fundamental para evaluar la calidad del alimento. La adición de proteasas como la papaína a la alimentación animal puede aumentar la asimilación y la biodisponibilidad de las proteínas, lo que se traduce en importantes ahorros económicos (52). También es empleada la papaína para hidrolizar las proteínas de la harina de soja para la alimentación de los peces, observándose una mayor ganancia de peso relativa y un mejor rendimiento de crecimiento en peces alimentados con gránulos tratados con papaína (53).

2.4.1.8. Producción de hidrolizados de proteínas

Los hidrolizados de proteínas se utilizan ampliamente en la industria con muchas aplicaciones diferentes. Como resultado de la hidrólisis, la proteína original forma péptidos de diferentes tamaños según la enzima empleada y los parámetros operativos, presentando altas propiedades antioxidantes. Los péptidos con efecto positivo para la salud se denominan péptidos bioactivos y pueden regular varias funciones fisiológicas. Se han estudiado ampliamente muchas cualidades bioactivas de los hidrolizados de proteínas con papaína, como antitumoral, antioxidante, antidiabético, inhibidor de la angiotensinami, enzima convertidora, modulación del sistema inmunitario y capacidad de unión de minerales (54). Otra aplicación reciente de la papaína para la producción de hidrolizados antioxidantes es la nuez china (*Juglans regia*.) hidrolizados. Los investigadores habían obtenido péptidos de hidrolizados de proteína de

nuez, y estos péptidos exhibieron las altas actividades antioxidantes. El objetivo de este estudio fue desarrollar un método simple y conveniente para una fácil y preparación reproducible de péptidos antioxidantes a partir de hidrolizados de proteína de nuez (10).

Una de las enzimas usadas para la extracción de estos antioxidantes fue la papaína.

2.4.2. La papaína y su uso en la industria farmacéutica

A la *Carica papaya* se le atribuyen muchas propiedades curativas sobre todo en su aplicación tópica para curación de heridas cutáneas; por lo que se constituye en una alternativa terapéuticamente útil y de bajo costo. La papaína apoya el sistema de inmunidad para el tratamiento de tumores, ya que controla y modifica los leucocitos en respuesta a la reacción inmunitaria. Se reduce la hinchazón y el enrojecimiento de las articulaciones y la próstata (12).

El látex de *Carica papaya* ha demostrado actividad antimicrobiana, siendo esta característica muy beneficiosa para evitar complicaciones en el proceso de curación de heridas. El látex de *Carica papaya* contiene un amplio contenido de enzimas cisteína endopeptidasas, donde encontramos principalmente papaína, quimio papaína A y B, otras endopeptidasas, inhibidores de proteasas, linamarasas y proteínas sin funciones aun conocidas. Algunos estudios realizados se presentan en la tabla siguiente (10).

Tabla 15:

**Tabla comparación de autores; uso de la papaína en la industria farmacéutica
(Estudios)**

ESTUDIOS	ESTUDIO REALIZADO	RESULTADO
Hewitt et al, (80).	Descubrir si los métodos terapéuticos de su aplicación empírica para tratar las úlceras cutáneas tenían verdadera efectividad científica (80).	Demostró su efectividad científica (80).
Dawkins et al, (79).	Aplicaron un experimento en donde aplicaron trozos de frutas en diferentes estadios de maduras, y también semillas, en medios de cultivo con diferentes tipos de microorganismos (79).	Los trozos de frutas independientemente de su estadio de madurez y las semillas inhiben el crecimiento bacteriano; ósea tenían efectos antimicrobianos contra: B. cereus, E. coli, S. faecalis, S. aureus, P. vulgaris, S.flexneri (79).
Nayak et al, (78).	En ratas con diabetes inducido, donde se le aplicó extractos de Carica papaya (78).	Encontraron que en las que se les aplicó reducían un 77% el tamaño de la herida en comparación al 59% de los controles (78).
Ajlia et al, (77).	Se elaboró un ensayo experimental en ratas cuyo objetivo era ser la primera fase de un ensayo clínico, se utilizó un compuesto basado en papaína, la enzima proteolítica donde utilizaron ratas Sprague-Dawley (77).	Encontraron que efectivamente aceleraba el proceso de cicatrización y presentó también efectos antimicrobianos (77).
Nayak et al, (76).	Se utilizaron las semillas de la Carica papaya y alcohol etílico donde se monitorizó con biomacadores de inflamación y cicatrización como es la hidroxiprolina a nivel plasmático (76).	Comprobaron que el grupo que se le administró esté preparado presentó mejoría de la cicatrización (76).

Fuente: Áreas et al, (10).

Las aplicaciones de la papaína en medicina durante los últimos cinco años incluyen:

- a) El tratamiento de la impactación alimentaria esofágica proteica usando papaína y otras enzimas proteolíticas como tratamiento inicial para todos los pacientes con obstrucción esofágica (55).

- b) El tratamiento del acné leve a moderado con una combinación fija de retinoato de hidroxipinacolona al 0,1 % (éster sintético del ácido 9-cis-retinoico), retinol al 1 % en glicosferas y papaína al 2 % en glicosferas en gel acuoso (56).
- c) Reparación tisular de úlceras venosas empleando geles de papaína de baja concentración (57).
- d) Uso de papaína en la industria dental, donde las propiedades proteolíticas y antibacterianas de la papaína parecen ser una alternativa eficaz y segura para la eliminación de caries antes de emprender procedimientos de restauración. La papaína también se ha empleado para eliminar las caries químico-mecánico (CMCR), comercializado en 2003 como Papacarie (mezcla de papaína, cloramina, azul de toluidina y sales en una emulsión espesante) (58). Otros agentes eliminadores de caries quimiomecánicos similares a base de papaína son Apacaries (59, 60). Es un ingrediente activo en dentífricos que contienen diversas enzimas para eliminar las manchas de los dientes (57). Más recientemente, Münchow, Hamann, Carvajal, Pinal y Bottino (61).

Otro ejemplo interesante es el uso de papaína en el envasado de alimentos antimicrobianos. Cynthia, Prabhawathi y Mukesh, papaína inmovilizada en películas de poliuretano para evitar la contaminación microbiana del queso. Los resultados experimentales mostraron que este derivado podría ser utilizado como un agente efectivo para el control y reducción del crecimiento de *Staphylococcus aureus* formación de biopelículas (62). Del mismo modo, Manohar, Prabhawathi, Sivakumar y Doble, probó el efecto antimicrobiano de derivados de papaína inmovilizados contra *Acinetobacter*spp. y *S. aureus* (63).

2.4.3. La papaína y su uso en la industria cosmética

La industria cosmética está prestando atención al uso de enzimas para mejorar la belleza de la piel evitando problemas cutáneos. Diferentes problemas de la piel están tratando de resolver. En 2012, Sim, dedujeron que la papaína se combinó con biopolímero soluble de *Schizophyllum commune*. Las conjugaciones mejoraron la estabilidad y el almacenamiento en aceites cosméticos y tensioactivos. La capa córnea estratificada de la piel se exfoliaba de forma más eficaz con papaína que con ácidos lácticos, que es un agente ampliamente utilizado para la exfoliación (68).

Para determinar la reproducibilidad del método de extracción, se extrajo látex de 10 papayos diferentes, siendo esta la prueba de confiabilidad del método. Cada 5 mL de extracto fueron tratados de la misma manera y luego se hizo la determinación de la actividad enzimática por medio del método de la leche descrito en la metodología. Al aplicar el método se obtuvo el peso de caseína hidrolizada presente en la leche, que se muestra en la gráfica No. 2 y tabla No. 2. A partir de dichos datos se calculó la actividad 59 enzimática, siendo de 2,380,597.64 PU, equivalente a 1.11 gramos de papaína.

Se logró extraer la papaína de la *Carica papaya* por medio del método de prensado y purificación por medio de sulfatos. Se comprobó la actividad enzimática de los extractos ya que se demostró que el promedio (2,380,597.64 PU/g), se encontraba dentro de la curva promedio de actividad enzimática de la papaína estándar. La actividad enzimática de 5 mL de extracto del peciolo de la hoja de *Carica papaya*, es de 2,380,597.64 PU, equivalente a 1.11 gramos de papaína. Por medio de ensayo-error se determinó que 12 gramos de papaína experimental producen efecto exfoliante y que 20 gramos de dicha enzima producen efecto depilatorio.

Otras aplicaciones en la industria:

La papaína incluye el tratamiento del agua para la eliminación de metales pesados (64), o prevenir la floculación de la levadura en la industria del bioetanol (65), además de clarificar la cerveza (69), ablandador de carnes, preparación de hidrolizados de proteína, etc (70).

Tabla 16:

Procedimiento de producción de crema depilatoria

C R E M A DEPILATORIA			
FASE OLEOSA		FASE ACUOSA	
Ingrediente	Porcentaje (%)	Gramos (g)	Función
Ácido esteárico	6.27	8.00	Emulsificante
Alcohol cetílico	4.7	6.00	Emoliente
Miristato de isopropilo	1.1	1.40	Emoliente
Monoestearato de glicerilo	1.57	2.00	Emulsificante
Vaselina	5.48	7.00	Emoliente
Metilparabén	0.16	0.20	Preservante
Propilparabén	0.16	0.20	Preservante

Ingrediente	Porcentaje (%)	Gramos (g)	Función
Ácido cítrico	0.08	0.10	Modificador de pH
Carbómero 940	0.23	0.30	Estabilizador de emulsión, espesante.
Trietanolamina	1.88	2.40	Agente alcalinizante
Extracto de papaina	78.37	100 mL	p.a.

Procedimiento: Preparación	Procedimiento: Preparación
<p>Pesar: 8.0 g de ácido esteárico, 6.0 g de alcohol cetílico, 1.40 g de miristato de isopropilo, 2.0 g de monoestearato de glicerilo, 7.0 g de vaselina, 0.20 g de metilparabén y 0.20 g de propilparabén. o Preparar la estufa y el baño María. o Fundir el ácido esteárico. o Agregar el alcohol cetílico y dejar fundir. o Agregar el miristato de isopropilo y mezclar. o Agregar el monoestearato de glicerilo y mezclar. o Agregar la vaselina y mezclar. o Agregar los parabenos y mezclar.</p>	<p>Pesar: 0.10 g de ácido cítrico, 0.30 g de carbómero 940 y 2.40 g de trietanolamina Medir: 60 mL de extracto de papaina y 12.40 mL de agua destilada. Agregarlos a un recipiente grande. Agregar a la mezcla de extracto de papaina con agua destilada el ácido cítrico, agitar vigorosamente. Cuando esté completamente mezclado lo anterior, agregar el carbómero 940 y continuar mezclando. Cuando la mezcla sea homogénea, agregar la trietanolamina y continuar mezclando. o No calentar esta fase. Agregar la fase oleosa a la fase acuosa, con agitación constante. Dejar reposar la crema y que llegue a temperatura ambiente para envasar</p>

Fuente: Monzón y Chocano, (16).

Tabla 17:
Procedimiento de producción de crema exfoliante

CREMA EXFOLIANTE							
FASE OLEOSA				FASE ACUOSA			
Ingrediente	Porcentaje (%)	Gramos (g)	Función	Ingrediente	Porcentaje (%)	Gramos (g)	Función
Ácido esteárico	8.00	8.00	Emulsificante	Ácido cítrico	0.10	0.10	Modificador de pH
Alcohol cetílico	6.00	6.00	Emoliente	Carbómero 940	0.30	0.30	Estabilizador de emulsión, espesante.
Miristato de isopropilo	1.40	1.40	Emoliente	Trietanolamina	2.40	2.40	Agente alcalinizante
Monoestearato de glicerilo	2.00	2.00	Emulsificante	Extracto de papaína	60	60 mL	p.a.
Vaselina	7.00	7.00	Emoliente	Agua destilada	12.40	12.40	c.s.p.
Metilparabén	0.20	0.20	Preservante				
Propilparabén	0.20	0.20	Preservante				
Procedimiento: Preparación				Procedimiento: Preparación			
<p>Pesar: 8.0 g de ácido esteárico, 6.0 g de alcohol cetílico, 1.40 g de miristato de isopropilo, 2.0 g de monoestearato de glicerilo, 7.0 g de vaselina, 0.20 g de metilparabén y 0.20 g de propilparabén. o Preparar la estufa y el baño María.</p> <p>Fundir el ácido esteárico. o Agregar el alcohol cetílico y dejar fundir.</p> <p>Agregar el miristato de isopropilo y mezclar. Agregar el monoestearato de glicerilo y mezclar.</p> <p>Agregar la vaselina y mezclar. o Agregar los parabenos y mezclar</p>				<p>Pesar: 0.10 g de ácido cítrico, 0.30 g de carbómero 940 y 2.40 g de trietanolamina. o Medir: 60 mL de extracto de papaína y 12.40 mL de agua destilada. Agregarlos a un recipiente grande.</p> <p>Agregar a la mezcla de extracto de papaína con agua destilada el ácido cítrico, agitar vigorosamente.</p> <p>Cuando esté completamente mezclado lo anterior, agregar el carbómero 940 y continuar mezclando.</p> <p>Cuando la mezcla sea homogénea, agregar la trietanolamina y continuar mezclando. o No calentar esta fase.</p> <p>Agregar la fase oleosa a la fase acuosa, con agitación constante.</p> <p>Dejar reposar la crema y que llegue a temperatura ambiente para envasar.</p>			

Fuente: Monzón y Chocano, (16).

Tabla 18:
Procedimiento de producción de gel

G E L							
DEPILATORIO: FÓRMULA CUANTI-CUALITATIVA				EXFOLIANTE: FÓRMULA CUANTI-CUALITATIVA			
Ingrediente	Porcentaje (%)	Peso/ medida	Función	Ingrediente	Porcentaje (%)	Peso/ medida	Función
Extracto de papaína	86.17	100 mL	p.a.	Extracto de papaína	84.71	60 mL	p.a.
Carbómero 940	4.31	5 g	Modificador de reología	Carbómero 940	4.22	3 g	Modificador de reología
Metilparabén	0.04	0.05 g	Conservante	Metilparabén	0.04	0.03 g	Conservante
Trietanolamina	5.17	6 mL	Modificador de pH	Trietanolamina	4.22	3 mL	Modificador de pH
Propilenglicol	4.31	5 mL	Diluyente	Propilenglicol	7.05	5 mL	Diluyente
Procedimiento: Preparación				Procedimiento: Preparación			
<p>Pesar: 0.05 gramos de metilparabén, 5 gramos de carbómero 940. o Medir: 5 mL de propilenglicol, 6 mL de trietanolamina y 100 mL de extracto de papaína.</p> <p>Disolver metilparabén en propilenglicol, con agitación. o Añadir carbómero 940 al extracto de papaína y agitar suavemente.</p> <p>Añadir la mezcla de metilparabén y propilenglicol a la mezcla de carbómero 940 y extracto de papaína.</p> <p>Agitar hasta que esté uniforme</p>				<p>o Pesar: 0.03 gramos de metilparabén, 3 gramos de carbómero 940. o Medir: 5 mL de propilenglicol, 3 mL de trietanolamina y 60 mL de extracto de papaína. o Disolver metilparabén en propilenglicol, con agitación. o Añadir carbómero 940 al extracto de papaína y agitar suavemente. o Añadir la mezcla de metilparabén y propilenglicol a la mezcla de carbómero 940 y extracto de papaína. o Agitar hasta que esté uniforme</p>			

Fuente: Monzón y Chocano, (16).

La papaína como enzima, tiene propiedades proteolíticas que provocan la ruptura de múltiples enlaces de diferentes proteínas. A partir de este concepto, se utilizó la papaína como principio activo en dos formulaciones cosméticas destinadas para uso depilatorio y otras dos para uso exfoliante. Considerando que el vello y las células muertas a eliminar, mediante los procesos de depilación y exfoliación, respectivamente, están formados por proteínas, se pueden remover mediante la proteólisis provocada por la enzima.

PERSPECTIVAS A FUTURO

La perspectiva respecto a los métodos de purificación se orienta hacia el uso de nuevos métodos de inmovilización, existen numerosos métodos para esta, empezando por métodos sin soporte, y siguiendo con métodos donde se utiliza retención física o química de un enzima sobre un soporte, los cuales presentan numerosas ventajas frente a los tradicionales. Algunas de las pautas generales que se deben seguir para la elección de estos métodos: Estudiar en primera instancia la reacción y las condiciones en las que se va a desarrollar, seleccionando los soportes inorgánicos que presentan mayores ventajas frente a los orgánicos, como es la alta estabilidad ante las degradaciones químicas y físicas, aunque la gran mayoría de procesos industriales se realizan con soportes orgánicos por a la afinidad con las enzimas. Pueden ser utilizados a modo de material filtrante con doble efecto, es decir, la partícula en sí funciona para contaminantes grandes y las enzimas actúan sobre material microscópico o haciéndolo reaccionar para anular su efecto (66).

Los materiales de inmovilización poseen muchos tamaños, su selección es un factor muy importante a la hora de diseñar una enzima inmovilizada para una reacción deseada. Y, se deben evaluar alternativas y soportes que permitan una fácil y completa recuperación del preparado y que aumenten la efectividad de la enzima. En la selección de los soportes se debe tener en cuenta una serie de características, tales como: la resistencia física a la compresión, la hidrofobicidad, la biocompatibilidad, la resistencia el ataque microbiano, los bajos costes, la temperatura y pH. De esta manera la aplicación de la papaina, a partir de la aplicación de los nuevos métodos de inmovilización permite que las enzimas puedan reutilizarse repetidamente en los procesos, ya sea de forma continua o discontinua (67).

Las reutilizaciones no pueden ser infinitas, hay límites sanitarios y biológicos que no lo permiten, así la aplicación de las enzimas inmovilizadas puede ser utilizadas en:

- a. Hidrolisis de proteínas. Utilizadas con el fin de modificar el contenido proteico de los alimentos, de allí que se logra obtener materias primas de mayor calidad a menor precio, por ejemplo, en el trigo se emplean pepsina y proteasa inmovilizadas en chito san y en el queso son empleadas lactoglobulina en la leche (66).
- b. Hidrolisis de hidratos de carbono. En la leche son empleadas para algunos derivados lácteos sin lactosa, para hacerlos aptos para consumidores que carecen de lactasa intestinal. Otra hidrolisis es la degradación del almidón de diversas fuentes vegetales

para obtener los jarabes de fructosa y glucosa empleados en la fabricación de refrescos y bebidas azucaradas. En frutas y verduras son empleadas las pectinas para clarificar los zumos, hacerlos menos viscosos y más concentrados. Son inmovilizadas sobre soportes como PVC, poliésteres, poliacrilamidas y alúmina (67).

- c. Mejora de las características organolépticas de algunos alimentos. El empleo de células de *Arthobacter globilis* atrapadas en poliacrilamida permite eliminar el sabor amargo del zumo de los cítricos (66).
- d. Obtención de edulcorantes y aditivos alimentarios. En la fabricación de zumos, mermeladas y dulces es utilizado el ácido L-málico que es obtenido por la fumarasa de *Brevibacterium flavum* atrapada en k-carragenato. En este sector han surgido grandes avances para la obtención de azúcares bajos en calorías como son el aspartamo y la estevia (67).
- e. Otras aplicaciones. Con el uso de lipasa inmovilizada se puede sustituir el ácido palmítico de las posiciones 1 y 3 del aceite de palma por ácido esteárico y de ese modo poder emplear en la industria del chocolate. Los productos del chocolate tienen aproximadamente un 30% de grasa, lo cual es de interés que sea de gran valor y saludable (66).

También podemos resaltar que la presente investigación tiene como finalidad el uso de los recursos locales como son la *Carica papaya* var. *Arequipensis* y su comparación en la extracción de papaína a comparación de la *Carica papaya* que es la más estudiada para la extracción de esta.

CONCLUSIONES

- PRIMERA.** – Hay varios métodos de prueba para evaluar la actividad de la papaína. Uno de ellos se centra en la hidrólisis de moléculas de sustratos sintéticos de bajo peso molecular, siendo más precisos y costosos, pero menos relevantes para usos prácticos. Otro enfoque se basa en la hidrólisis de sustratos proteicos, con una amplia gama de opciones disponibles, siendo más útiles y confiables. Además, existen métodos que aprovechan la capacidad de la enzima para coagular la leche, siendo más económicos en cuanto a materiales, pero no en términos de tiempo requerido.
- SEGUNDA.** - Los métodos principales que se usan en el proceso de extracción, concentración y purificación de la papaína, se encuentran el usado por Puig, siguió el proceso de extracción y purificación, determinando que el látex de los frutos inmaduros es la mejor fuente para la obtención de papaína. Mundo Y Serrano aplicó el método modificado de Kunitz basado en el grado de hidrólisis de los sustratos proteicos a través del estriado o incisiones longitudinales en la cáscara, en otro estudio se usó la liofilización del látex que consiste en una desecación del sólido que contiene disolvente Monti¹, y otros Brasil, realizaron el experimento a través de aislamiento y cristalización de papaína: Monzón y Chocano, en Guatemala trabajo con el método para la obtención del látex, de extracción cortando el peciolo de la hoja de la planta Carica papaya y Aguirre y Castillo extrajeron el látex de la fruta. En todos los casos se concluye en que la papaína extraída mantiene propiedades de purificación similares.
- TERCERA.**- Los usos industriales de la papaína en la industria alimentaria fundamentalmente se desarrolla en la industria láctea, como agente coagulante de la leche, como agente ablandador de carne, en el ahumado, en la industria de panificación se utiliza para , producir harina hipoadérgica, mejorando la calidad de la masa, Industria cervecera y vitivinícola La papaína es una enzima muy utilizada en la industria cervecera, especialmente en la producción de cervezas ligeras y claras, y se aplica de manera eficiente como biocatalizador en la industria del vino. También se usa como alimento animal; también presenta cualidades

bioactivas de los hidrolizados de proteínas con papaína y es aplicada para la producción de hidrolizados antioxidantes es la nuez china

CUARTA. - Los usos industriales de la papaína en la industria farmacéutica, entre sus múltiples usos se encuentran la aplicación tópica para curación de heridas cutáneas, apoya el sistema de inmunidad para el tratamiento de tumores, ha demostrado actividad antimicrobiana, aceleraba el proceso de cicatrización, en el tratamiento inicial para todos los pacientes con obstrucción esofágica, tratamiento del acné leve a moderado, en la reparación tisular de úlceras venosas y en la industria dental.

QUINTA. - La papaína como enzima, tiene propiedades proteolíticas que provocan la ruptura de múltiples enlaces de diferentes proteínas. A partir de este concepto, se utilizó la papaína como principio activo en dos formulaciones cosméticas destinadas para uso depilatorio y otras dos para uso exfoliante.

RECOMENDACIONES

- PRIMERA** Explorar métodos emergentes: Considerar investigar y comparar métodos de purificación emergentes o innovadores que estén siendo desarrollados en la actualidad. Estos métodos podrían ofrecer ventajas significativas en términos de eficiencia, sostenibilidad o economía. Examina tecnologías como la electrodiálisis, la purificación con membranas selectivas o los procesos basados en nanomateriales, entre otros.
- SEGUNDA** Análisis de tendencias futuras: Investigar las tendencias y avances tecnológicos en el campo de la purificación industrial y pronostica cómo podrían influir en los métodos de purificación utilizados en el futuro.
- TERCERA** Evaluación económica y comercial: Ampliar el enfoque para incluir una evaluación económica y comercial de los métodos de purificación utilizados en las diferentes industrias. Considerar factores como el costo de implementación, el retorno de la inversión, la disponibilidad de equipos y materiales, y las implicaciones legales y regulatorias. Realizar un análisis comparativo de los aspectos económicos y comerciales de cada método para proporcionar una visión completa de su viabilidad en el mercado.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Villavicencio Marcial MC. Extracción, concentración y cuantificación de la actividad enzimática de la papaína a partir de la papaya (carica papaya) [Internet] [bachelorThesis]. [Ecuador]: Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Carrera de Ingeniería Bioquímica; 2011 [citado 12 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://repositorio.uta.edu.ec:8443/jspui/handle/123456789/5226>
2. Patel T. Papain enzyme: a digestive aid. International Journal of Clinical and Biomedical Research. 29 de enero de 2016;52-3.
3. Food News Latam - ¿Para qué se utiliza la papaína? [Internet].; 2021 [citado 12 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://www.foodnewslatam.com/paises/4749-%C2%BFpara-qu%C3%A9-se-utiliza-la-papa%C3%ADna.html>
4. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias.; 2021 Disponible en: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/about-codex/es/>
5. Avila R, Tovar Y. Evaluación de metodologías para la purificación y cuantificación de la actividad enzimática de la papaína extraída de la lechosa. (Evaluation of methodologies for the purification and quantification of the enzymatic activity of papain from papaya). 2018 nov 21; Venezuela.
6. Liu MC, Yang SJ, Hong D, Yang JP, Liu M, Lin Y, et al. A simple and convenient method for the preparation of antioxidant peptides from walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates. Chemistry Central Journal. 21 de junio de 2016;10(1):39.
7. Meinschmidt P, Sussmann D, Schweiggert-Weisz U, Eisner P. Enzymatic treatment of soy protein isolates: effects on the potential allergenicity, technofunctionality, and sensory properties. Food Sci Nutr. 29 de junio de 2015;4(1):11-23.
8. Bustamante. Especialistas del INDES-CES producen queso con cuajo natural a base de papaína - UNTRM [Internet].; 2021 [citado 12 de diciembre de 2022] Disponible en: <https://untrm.edu.pe/en/category-table/55-noticias/2662-especialistas-del-indeces-producen-queso-con-cuajo-natural-a-base-de-papaina.html>
9. Puig Rodríguez AM. Desarrollo de un proceso para la extracción de papaína en Colombia [Internet]. [Bogotá]: Universidad de los Andes; 2008 [citado 12 de

diciembre de 2022]. Disponible en:
<https://repositorio.uniandes.edu.co/handle/1992/23586>

10. Áreas et al. Elaboración de un compuesto farmacológico a base de látex de Carica papaya con actividad cicatrizante evaluada en modelo experimental in vivo en ratas Wistar, con amputación de colas en la Facultad de Ciencias Médicas de Julio-Octubre 2012 [Internet]. [Nicaragua]: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua; 2015. Disponible en: <https://repositorio.cnu.edu.ni/Record/RepoUNANM1184>
11. Mengarelli R, Belatti A, Bilevich E, Gorosito S, Fernández P. La importancia del desbridamiento en heridas crónicas. 2013;8.
12. Morse CR, Wang H, Donahue DM, Garrity JM, Allan JS. Use of Proteolytic Enzymes in the Treatment of Proteinaceous Esophageal Food Impaction. J Emerg Med. enero de 2016;50(1):183-6.
13. Del Moral S, Ramírez-Coutiño L, García-Gómez M. Aspectos relevantes del uso de enzimas en la industria de los alimentos [Internet]. México: Universidad del Papaloapan Tuxtepec; 2015 jun. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/277587055_Aspectos_relevantes_del_uso_de_enzimas_en_la_industria_de_los_alimentos
15. Fernández et al. New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry. Trends in Food Science & Technology. 1 de octubre de 2017;68:91-101.
16. Monzón Corado R, Chocano Martínez AE. Extracción de papaína del látex de la Carica papaya (Papayo) y usos en dos formulaciones depilatorias y dos formulaciones exfoliantes como principio activo natural.-- / [Internet]. [Guatemala]: Universidad de San Carlos de Guatemala; 2014 [citado 4 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.biblioteca-farmacia.usac.edu.gt/>
17. Mundo; Serrano. Extracción de la enzima papaina del latex de Carica papaya (papayo) cultivado en el país y su aplicación en cicatrices tipo queiloide y verrugas. 2 de marzo de 2017 [citado 12 de diciembre de 2022]; Disponible en: <http://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/158891>
18. Silva et al. Papaya (Carica papaya L.) biology and biotechnology. Tree and Forestry Science and Biotechnology, 2007, vol. 1, no 1, p. 47-73.

19. Arango, Mejia. Plantas medicinales: botanica de interest medico; 2006. 427 p.
20. Mejía Aguilar RB, Vega Ramos CX. Medición de la actividad proteolítica de la enzima papaina natural extraída del latex de papayo (carica papaya) e inmovilizada en gel de agar [Internet] [bachelor]. Universidad de El Salvador; 2010 [citado 12 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://ri.ues.edu.sv/id/eprint/2516/>
21. Osuna Torres L. Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales [Internet]. Barcelona: Publicacions i Edicions, Universitat de Barcelona; 2005 [citado 12 de diciembre de 2022]. 173 p. Disponible en: <http://datos.bne.es>
22. Carica papaya: composición química y actividad biológica de sus extractos [Internet].; 2021 vLex. [citado 12 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://vlex.com.mx/vid/qua-mica-actividad-extractos-445250658>
23. Aguirre E, Castillo P. Extracción y estudio comparativo de las enzimas proteolíticas del fruto toronche (carica-stipulata) y de la papaya (carica-papaya) y su aplicación en la industria alimenticia. Guayaquil. Escuela Superior Politécnica del Litoral [Internet]. 15 de septiembre de 2009 [citado 13 de diciembre de 2022]; Disponible en: <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/7532>
24. Gennaro AR . Remington Farmacia. Ed. Médica Panamericana; 2003. 1412 p.
25. Gutiérrez AIF, Nolasco O, Cruz CS. Purificación y caracterización preliminar de proteasas del látex de Vasconcellea candicans (A. Gray) A. DC (Mito). Scientia Agropecuaria. 3 de abril de 2017;8(1):7-17.
26. Botina KD. Actividad proteolítica (actividad enzimática.; 2021 [citado 13 de diciembre de 2022]; Disponible en: https://www.academia.edu/35739764/Actividad_proteol%C3%ADtica_actividad_enzim%C3%A1tica
27. Yugcha et al. “Estudio del proceso de secado del látex de papaya (carica papaya l.) deshidratado por aspersión”. 13 de junio de 2013 [citado 13 de diciembre de 2022]; Disponible en: <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/24551>
28. Ramírez J, Ayala M. Enzimas: ¿qué son y cómo funcionan? 1 de noviembre de 2014 [citado 13 de diciembre de 2022];15(11). Disponible en: <https://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art91/index.html>

29. García Flores VA, Roldán Cerna Ed. Ensayo de actividad de la enzima papaina inmovilizada y su aplicación en aguas residuales de la industria alimenticia [Internet] [bachelor]. Universidad de El Salvador; 2005 [citado 13 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://ri.ues.edu.sv/id/eprint/5208/>
30. Yuhai H, Saufi S, Chong FC. Purification of papain from unclarified papaya juice using reversed phase expanded bed adsorption chromatography (RP-EBAC). *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 28 de enero de 2014;20.
31. Kirsch JF, Igelström M. The Kinetics of the Papain-Catalyzed Hydrolysis of Esters of Carbobenzoxyglycine. Evidence for an Acyl-Enzyme Intermediate*. *Biochemistry*. 1 de febrero de 1966;5(2):783-91.
32. Ángeles Martínez L. Dimensionamiento y simulación de un secador por aspersión de nivel piloto. 9 de noviembre de 2016 [citado 13 de diciembre de 2022]; Disponible en: <http://tesis.ipn.mx:8080/xmlui/handle/123456789/19804>
33. Muñoz et al. Uso de papaína y bromelina y su efecto en las características organolépticas y bromatológicas de chuletas de cerdo ahumadas. *RECUS: Revista Electrónica Cooperación Universidad Sociedad*. 2019;4(2):38-42.
34. Esti M, Benucci C, Lombardelli K, Garzillo A. Papaína del fruto de papaya (*Carica papaya* L.) y látex: Caracterización preliminar en tampón alcohólicoácido para aplicación en vino. *Food Bioprod*. 2013;91(4).
35. Jacob M, Jaros D, Rohm H. Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology*. 2011;64(1):14-33.
36. Arbita A, Kristijarti A, Ardelia I. The Effects of the Types of Milk (Cow, Goat, Soya) and Enzymes (Rennet, Papain, Bromelain) Toward Cheddar Cheese Production. *Makara Journal of Technology*. 30 de abril de 2015;19:31.
37. Mahajan R, Chaudhari G. Plant latex as vegetable source for milk clotting enzymes and their use in cheese preparation. *International Journal of Advanced Research*. 1 de mayo de 2014;2(5):1173-81.
38. Abu-Alruz K, Mazahreh A, Quasem J, Hejazin R, Qudah J. Effect of Proteases on Meltability and Stretchability of Nabulsi Cheese. 1 de enero de 2009;4(3):6.

39. Abe N, Wu CY, Kim YK, Fujii T, Abe K. Development of an efficient soymilk cream production method by papain digestion, heat treatment, and low-speed centrifugation. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2015;79(11):1890-2.
40. Hafid K, John J, Sayah TM, Domínguez R, Becila S, Lamri M, et al. One-step recovery of latex papain from *Carica papaya* using three phase partitioning and its use as milk-clotting and meat-tenderizing agent. *Int J Biol Macromol.* 1 de marzo de 2020;146:798-810.
41. Pietrasik Z, Shand PJ. Effects of moisture enhancement, enzyme treatment, and blade tenderization on the processing characteristics and tenderness of beef semimembranosus steaks. *Meat Science.* 1 de mayo de 2011;88(1):8-13.
42. Bekhit AA, Hopkins DL, Geesink G, Bekhit AA, Franks P. Exogenous proteases for meat tenderization. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2014;54(8):1012-31.
43. Sullivan GA, Calkins CR. Application of exogenous enzymes to beef muscle of high and low-connective tissue. *Meat Sci.* agosto de 2010;85(4):730-4.
44. Gil, Maritza A., et al. Papaína extraída a partir de la cáscara de la papayuela perteneciente a la especie (*Carica papaya* L.), por medio de microondas con aplicación en el ablandamiento de la carne bovina. *Journal of Engineering and Technology*, 2012, vol. 1, no 2.
45. Godoy Astelarra J. Ablandamiento de carne de cefalópodo (*Todarodes sagittatus*) mediante papaína. Efecto del tratamiento de cocción [Internet] [Maestría]. [Valencia]: Universidad Politécnica de Valencia; 2020 [citado 13 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://riunet.upv.es/handle/10251/151929>
46. Flores JF. Actividad proteolítica de la papaína extraída de la papaya (*carica papaya*) variedad común en el ablandamiento de la carne de sajino (*tayassu tajacu*). *tzhoeoen.* 12 de diciembre de 2018;10(4):610-29.
47. Fuentes A, Fernández-Segovia I, Serra JA, Barat JM. Development of a smoked sea bass product with partial sodium replacement. *LWT - Food Science and Technology.* 1 de noviembre de 2010;43(9):1426-33.
48. Mestre. R Ahumados [Internet]. 2013. Disponible en: <http://www.cartavariada.com/ahumados#.WysXA6dKjIU>

49. Li Y, Yu J, Goktepe I, Ahmedna M. The potential of papain and alcalase enzymes and process optimizations to reduce allergenic gliadins in wheat flour. *Food Chemistry*. 1 de octubre de 2015;196.
50. Kong X, Zhou H, Qian H. Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates. *Food Chemistry*. 1 de enero de 2007;102(3):759-63.
51. Polaina J, MacCabe AP. *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*. Springer Netherlands; 2010. 641 p.
52. Mo WY, Lau Rss, Kwok Ack, Wong Mh. Use of soybean meal and papain to partially replace animal protein for culturing three marine fish species: Fish growth and water quality. *Environ Pollut*. diciembre de 2016;219:815-20.
53. Nesse Ko, Nagalakshmi AP, Marimuthu P, Singh M. Efficacy of a fish protein hydrolysate in malnourished children. *Indian J Clin Biochem*. octubre de 2011;26(4):360-5.
54. Shouket H, Ameen I, Tursunov O, Kholikova K, Pirimov O, Kurbonov N, et al. Study on industrial applications of papain: A succinct review. *IOP Conference Series Earth and Environmental Science*. 18 de diciembre de 2020;614:012171.
55. Veraldi S, Barbareschi M, Guanziroli E, Bettoli V, Minghetti S, Capitanio B, et al. Treatment of mild to moderate acne with a fixed combination of hydroxypinacolone retinoate, retinol glycospheres and papain glycospheres. *G Ital Dermatol Venereol*. abril de 2015;150(2):143-7.
56. Ribeiro Apl, Oliveira Bgrb de, Soares Mf, Barreto Bmf, Futuro DO, Castilho SR de. Effectiveness Of 2% And 4% Papain Gels In The Healing Of Venous Ulcers. *Rev esc enferm USP*. junio de 2015;49:394-400.
57. Bussadori SK, Godoy Chl de, Alfaya Ta, Fernandes Kps, Mesquita-Ferrari RA, Motta LJ. Chemo-mechanical caries removal with PapacarieTM: case series with 84 reports and 12 months of follow-up. *J Contemp Dent Pract*. 1 de marzo de 2014;15(2):250-3.
58. Juntavee A, Peerapattana J, Ratanathongkam A, Nualkaew N, Chatchiwattana S, Treesuwan P. The Antibacterial Effects of Apacaries Gel on *Streptococcus mutans*: An in vitro Study. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2014;7(2):77-81.

59. Venkataraghavan K, Kush A, Lakshminarayana C, Diwakar L, Ravikumar P, Patil S, et al. Chemomechanical Caries Removal: A Review & Study of an Indigenously Developed Agent (Carie Care (TM) Gel) In Children. *J Int Oral Health*. agosto de 2013;5(4):84-90.
60. Chakravarthy P, Acharya S. Efficacy of extrinsic stain removal by novel dentifrice containing papain and bromelain extracts. *J Young Pharm*. octubre de 2012;4(4):245-9.
61. Münchow EA, Hamann HJ, Carvajal MT, Pinal R, Bottino MC. Stain removal effect of novel papain- and bromelain-containing gels applied to enamel. *Clin Oral Investig*. noviembre de 2016;20(8):2315-20.
62. Cynthia M, Prabhawathi V, Mukesh D. Papain Immobilized Polyurethane Film as Antimicrobial Food Package. *Revista Internacional de Ingeniería Biológica, Biomolecular, Agrícola, Alimentaria y Biotecnológica [Internet]*. 4 de noviembre de 2014 [citado 13 de diciembre de 2022];8. Disponible en: <https://zenodo.org/record/1097287>
63. Manohar Cm, Prabhawathi V, Sivakumar Pm, Doble M. Design of a papain immobilized antimicrobial food package with curcumin as a crosslinker. *PLoS One*. 2015;10(4):e0121665.
64. Metin AÜ, Alver E. Fibrous polymer-grafted chitosan/clay composite beads as a carrier for immobilization of papain and its usability for mercury elimination. *Bioprocess Biosyst Eng*. julio de 2016;39(7):1137-49.
65. Silva Df, Rosa H, Carvalho Afa, Oliva-Neto P. Immobilization of Papain on Chitin and Chitosan and Recycling of Soluble Enzyme for Deflocculation of *Saccharomyces cerevisiae* from Bioethanol Distilleries. *Enzyme Res*. 2015;2015:573721.
66. Biasutti, et al. Utilización de dos soportes para la inmovilización de la papaína. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 2006, vol. 47, no 4, p. 425-435.
67. Quesada, Alida López, et al. Caracterización del Cultivo del Ácaro del Polvo D. Siboney como Materia Prima para la Producción de Extractos Alergénicos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 2005, vol. 36.
68. Pinazo, et al. Extracción de la papaína de *Carica papaya* var. Arequipensis. *Véritas*, 2017, vol. 9, no 1, p. 128-135.

69. Troncoso et al. Production of plant proteases and new biotechnological applications: an updated review. *ChemistryOpen*, 2022, vol. 11, no 3, p. e202200017.
70. Dupaigne, P. Quelques applications industrielles de produits entrant dans la composition des fruits: enzymes. 1973.
71. Monti, Rubens, et al. Purification of papain from fresh latex of *Carica papaya*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2000, vol. 43, p. 501-507.
72. Hernández, r.; Fernández, c.; Baptista, p. Metodología de la investigación. 6ta Edición Sampieri. Soriano, RR (1991). Guía para realizar investigaciones sociales. Plaza y Valdés, 2016.
73. Mundo Zuna, Juan Carlos; Serrano Acosta, Daniel. Extracción de la enzima papaína del latex de *Carica papaya* (papayo) cultivado en el país y su aplicación en cicatrices tipo queiloide y verrugas. 2012.
74. Herrera López, Emily Esther; Ruiz Yóplac, Lord Kelvin. Efecto del tiempo de congelación y temperatura de liofilizado del latex del fruto de papayita de monte (*Carica Pubescens*) sobre su actividad proteolítica en leche de vaca. 2014.
75. Itzhaki; Gill. A micro-biuret method for estimating proteins. *Analytical Biochemistry*, 1964, vol. 9, p. 401-410.
76. Nayak et al. Wound-healing potential of an ethanol extract of *Carica papaya* (*Caricaceae*) seeds. *International Wound Journal*, 2012, vol. 9, no 6, p. 650-655.
77. Ajlia et al. Efficacy of papain-based wound cleanser in promoting wound regeneration. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 2010, vol. 13, no 12, p. 596-603.
78. Nayak et al. Wound healing activity of *Carica papaya* L. in experimentally induced diabetic rats. 2007.
79. Dawkins et al. Antibacterial effects of *Carica papaya* fruit on common wound organisms. *The West Indian Medical Journal*, 2003, vol. 52, no 4, p. 290-292.
80. Hewitt et al. Topical use of papaya in chronic skin ulcer therapy in Jamaica. *The west Indian medical journal*, 2000, vol. 49, no 1, p. 32-33.

COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE PURIFICACIÓN DE LA PAPAÍNA, UTILIZADAS EN DIFERENTES INDUSTRIAS. AREQUIPA, 2022

INFORME DE ORIGINALIDAD

8%

INDICE DE SIMILITUD

8%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

2%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	revistas.utm.edu.ec Fuente de Internet	2%
2	repositorio.unac.edu.pe Fuente de Internet	1%
3	www.ufrb.edu.br Fuente de Internet	1%
4	www.researchgate.net Fuente de Internet	1%
5	revistas.ucsm.edu.pe Fuente de Internet	1%
6	Submitted to Universidad Miguel Hernandez Servicios Informaticos Trabajo del estudiante	1%
7	Submitted to UNIV DE LAS AMERICAS Trabajo del estudiante	1%
8	revistas.uss.edu.pe Fuente de Internet	1%

Excluir citas

Apagado

Excluir coincidencias < 1%

Excluir bibliografía

Apagado