



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

**Inmovilización de papaína a partir de *Carica papaya*
“papaya” sobre tierra de diatomeas**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biotecnología

AUTOR

Hugo Roberto LUNA MOLERO

ASESOR

Dra. Amparo Iris ZAVALETA PESANTES

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Luna, H. (2017). *Inmovilización de papaína a partir de Carica papaya “papaya” sobre tierra de diatomeas*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	HUGO ROBERTO LUNA MOLERO
DNI	28289824
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-9475-8821
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	AMPARO IRIS ZAVALETA PESANTES
DNI	17880045
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-3844-7185
Datos de investigación	
Línea de investigación	B.2.6.1. Biotecnología de enzimas
Grupo de investigación	No aplica.
Agencia de financiamiento	Sin financiamiento.
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, Laboratorio de Bioquímica de la Facultas de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga - Ciudad Universitaria Departamento: Ayacucho Provincia: Huamanga Distrito: Ayacucho Calle: (según corresponda) Latitud: -13.1479852 Longitud: -74.2219243
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Abril 2010 – diciembre 2014
URL de disciplinas OCDE	Biotechnología agrícola, Biotechnología alimentaria https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.04.01 Bioquímica, Biología molecular https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
UNIDAD DE POSGRADO



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR
AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA

Siendo las **08:30 hrs. del 07 de septiembre de 2017** se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Examinador y Calificador de tesis, presidido por la Dra. Luisa Pacifica Negrón Ballarte e integrado por los siguientes miembros: Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes (Asesora), Dra. Yadira Fernández Jerí, la Mg. Acela Inés Arnao Salas y Mg. Gloria Clotilde Gordillo Rocha; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **"Inmovilización de papaína a partir de *Carica papaya*" papaína" sobre tierra de diatomeas"**, presentado por el Bachiller en Farmacia y Bioquímica **HUGO ROBERTO LUNA MOLERO**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Biotecnología**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

A continuación el Jurado Examinador y Calificador de tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

17 (Diecisiete) Muy Bueno

Luego, la Presidenta del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Bachiller en Farmacia y Bioquímica **HUGO ROBERTO LUNA MOLERO**, el Grado Académico de Magíster en **Biotecnología**.

Siendo las 10:00 hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las 10:15 hrs. del 07 de septiembre de 2017.

Luisa Pacifica Negrón Ballarte
Dra. Luisa Pacifica Negrón Ballarte (P.P., D.E.)
Presidenta

Amparo Iris Zavaleta Pesantes
Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes (P.P., T.C.)
Miembro - Asesora

Yadira Fernández Jerí
Dra. Yadira Fernández Jerí (P. Asoc. T.C.)
Miembro

Gloria Clotilde Gordillo Rocha
Mg. Gloria Clotilde Gordillo Rocha (P.P., T.C.)
Miembro

Acela Inés Arnao Salas
Mg. Acela Inés Arnao Salas
Miembro

Observaciones:

A la memoria de mi padre, Hugo Roberto

*A mi madre Graciela, con total gratitud por su entrega a
sus hijos, por sus sabios consejos, por su eterna
compañía... sin ella no sería nada*

A mis hermanos: Antonieta, Sandra, Graciela

Yodna, Abhi Gail, Ivonne (†), Michael.

Dios y la Vida me han concedido los más bellos regalos:

Mi familia, mis amigos, y mis maestros.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Inés Arnao Salas, por su valiosa asesoría y dedicación, por sus observaciones, críticas y aportes en la ejecución y redacción del presente trabajo

A la Dra. Amparo Zavaleta Pesantes, por su asesoría que ha permitido la culminación de este trabajo de investigación

A la Dra. Yadira Fernández Jerí por sus orientaciones científicas que han permitido darle una mejor perspectiva al presente trabajo.

Al Dr. José Manuel Diez Macavilca, por su constante apoyo, asesoría y sabios consejos.

Al Dr. José Alejandro Yarlequé Mujica, su apoyo incondicional en la ejecución del presente trabajo de investigación

Al jurado examinador y calificador

Dra. Luisa Pacífica Negrón Ballarte Presidenta

Dra. Amparo I. Zavaleta Pesantes Miembro

Dra. Yadira Fernández Jerí Miembro

Mg. Ácela Inés Arnao Salas Miembro

Mg. Gloria Gordillo Rocha Miembro

ÍNDICE GENERAL

	Pg.
Lista de tablas	vi
Lista de figuras	vii
Lista de anexos	viii
Resumen	ix
Summary	x
1 Introducción	1
1.1 Situación problemática	1
1.2 Formulación del problema	2
1.3 Justificación del teórica	3
1.4 Justificación práctica	4
1.5 Objetivos	4
1.5.1 Objetivo general	4
1.5.2 Objetivo específico	4
2 Marco teórico	5
2.1 Marco filosófico epistemológico de la investigación	5
2.2 Antecedentes de la investigación	6
2.3 Bases teóricas	8
2.3.1 Aspectos botánicos de las <i>caricaceae</i>	8
2.3.2 Clasificación taxonómica.	9
2.3.3. Aspectos químicos de la familia <i>caricaceae</i>	9
2.3.4 Bioquímica de la papaína	10
2.3.4.1 Clasificación	10
2.3.4.2 Mecanismo catalítico	10
2.3.4.3 Estructura	11
2.3.4.4 Usos de la papaína en la industria	12
2.3.4.5 Aplicaciones biotecnológicas de la papaína	12
2.3.4.6 Biocomercio de la papaína	12
2.4 Inmovilización de enzimas	14
2.4.1 Características de la inmovilización de enzimas	14
2.4.2 Métodos de inmovilización física de enzimas	15
2.4.2.1 Atrapamiento	15
2.4.2.2 Inclusión en membranas	15
2.4.3 Inmovilización de enzimas por afinidad química	16
2.4.3.1 Unión a soportes	16
2.5 Aplicaciones de las enzimas inmovilizadas	19
2.4.1 Biosensores	19
2.5.1.1 Aplicaciones de los biosensores	19
2.5.2 Aplicaciones médicas	20
2.5.3 Aplicaciones en la industria farmacéutica	20
2.5.3.1 Obtención de antibióticos β -lactámicos	21
2.5.3.2 Obtención de fármacos ópticamente puros	21
2.5.4. Aplicaciones en la industria alimentaria	22
2.5.4.1 En la hidrólisis de proteína	22
2.5.4.2 En la hidrólisis de hidratos de carbono	22
2.5.5 Aplicaciones en la industria química	23
2.6 Soportes usados en la inmovilización de enzimas	24

2.6.1	Soportes inorgánicos.	24
2.6.2	Soportes orgánicos.	24
2.7	Diatomeas	24
2.7.1	Composición química de la tierra de diatomeas	25
2.7.2	Usos de las diatomeas	26
2.7.2.1	Como insecticida	26
2.7.2.2	Como fertilizante	26
2.7.2.3	Como suplemento mineral	27
3	Metodología	28
3.1	Tipo de estudio y diseño	28
3.1.1	Universo y población	28
3.1.2	Unidad de muestreo y de análisis	28
3.1.3	Tamaño muestral	28
3.2	Régimen de investigación	28
3.3	Procedimientos	28
3.3.1	Extracción y estabilización de la papaína	28
3.3.2	Determinación de la actividad enzimática de la papaína libre sin inmovilizar	29
3.3.3	Inmovilización de la papaína	29
3.3.3.1	Preparación del soporte y la columna	29
3.3.3.2	Inmovilización de la enzima papaína	30
3.3.3.3	Efecto del pH, temperatura, tiempo de incubación en la inmovilización de la papaína en tres soportes	31
3.3.3.4	Determinación de la actividad enzimática de la papaína inmovilizada.	31
3.3.3.5	Determinación de proteínas por el método de Lowry	31
3.4	Análisis de datos	32
4	Resultados y Discusión	33
4.1	Resultados	33
4.1.1.	Extracción y estabilización de la papaína	33
4.1.2	Determinación de la actividad enzimática de la papaína libre	33
4.1.3	Determinación del índice de inmovilización	36
4.1.4	Determinación de la actividad enzimática de la papaína inmovilizada	37
4.2	Discusión	46
4.2.1	Análisis de datos	49
5	Impactos	53
	Conclusiones	54
	Recomendaciones	55
	Referencias bibliográficas	56
	Anexos	59

LISTA DE TABLAS

		Pg.
Tabla 1	Usos industriales y artesanales de la papaína	13
Tabla 2	Composición de las diatomeas	26
Tabla 3	Análisis de varianza de la inmovilización enzimática ANOVA	49
Tabla 4	Significancia estadística de la inmovilización enzimática Prueba de Duncan	49
Tabla 5	Significancia estadística de la inmovilización enzimática Prueba de Tukey	50
Tabla 6	Significancia estadística de la actividad enzimática Prueba de Tukey	52

:

LISTA DE FIGURAS

	Pg.
Figura 1	Esquema del mecanismo catalítico de la papaína 11
Figura 2	Estructura cristalina de la papaína 11
Figura 3	Actividad enzimática de la papaína libre de inmovilización 34
Figura 4	Comportamiento de la papaína e la degradación de la albúmina durante el tiempo 35
Figura 5	Determinación de las constantes catalíticas a través del diagrama de Lineweaver-Burk 36
Figura 6	Porcentaje de inmovilización de la enzima Papaína en tres soportes vs tiempo 37
Figura 7	Actividad enzimática de papaína inmovilizada en sílica a pH 7 y distintas temperaturas 38
Figura 8	Actividad enzimática de papaína inmovilizada en sílica a pH 7.5 y distintas temperaturas 39
Figura 9	Actividad enzimática de papaína inmovilizada en sílica a pH 8.0 y distintas temperaturas 40
Figura 10	Actividad enzimática de papaína inmovilizada en alúmina a pH 7 y distintas temperaturas 41
Figura 11	Actividad enzimática de papaína inmovilizada en alúmina a pH 7.5 y distintas temperaturas 42
Figura 12	Actividad enzimática de papaína inmovilizada en alúmina a pH 8.0 y distintas temperaturas 43
Figura 13	Actividad enzimática de papaína inmovilizada en diatomea a pH 7 y distintas temperaturas 44
Figura 14	Actividad enzimática de papaína inmovilizada en diatomea a pH 7.5 y distintas temperaturas 45
Figura 15	Actividad enzimática de papaína inmovilizada en diatomea a pH 8.0 y distintas temperaturas 46

LISTA DE ANEXOS

	Pg.	
Anexo 1	Frutos de <i>Carica papaya L</i>	60
Anexo 2	Proceso de incisión del fruto de <i>Carica papaya L</i>	61
Anexo 3	Obtención del látex de <i>Carica papaya L</i>	62
Anexo 4	Recojo del látex de la <i>Carica papaya L</i> y estabilización en buffer fosfato	63
Anexo 5	Recojo de bloques de tierra de diatomeas para molienda y tamizado	64
Anexo 6	Partículas de tierra de diatomeas	65
Anexo 7	Preparación de las columnas de inmovilización de tierra de diatomeas	66
Anexo 8	Absorbancias de las muestras eluidas con papaína inmovilizada en tres soportes a 25 °C	67
Anexo 9	Absorbancias de las muestras eluidas luego de ser tratadas con papaína inmovilizada en tres soportes a 30 °C	68
Anexo 10	Absorbancias de las muestras eluidas luego de ser tratadas con papaína inmovilizada en tres soportes a 35 °C	69
Anexo 11	Ensayos de la actividad enzimática de la papaína	70

RESUMEN

El objetivo del estudio fue inmovilizar la papaína del látex de *Carica papaya* “papaya” sobre tierra de diatomeas procedentes de las minas de Vista Alegre del distrito El Carmen Alto, Huamanga. Para ello, el látex fue recolectado de los frutos verdes de *Carica papaya*, del distrito de San Francisco a 600 m de altitud, La Mar (Ayacucho), en seguida el látex se estabilizó con buffer fosfato 100 mM a pH 7,5 y liofilizó. Por otro lado, la papaína 0,1 %(p/v) se inmovilizó por adsorción sobre tierra de diatomeas, sílica y alúmina a los 180 min; el índice de inmovilización fue 95,44%; 97,26% y 15,16% respectivamente. Las condiciones de actividad enzimática fueron pH 7,5 30 °C y 30 min, utilizando como sustrato la albúmina sérica bovina; la cuantificación de proteínas se realizó por el método de Lowry. De esta forma, la papaína soluble presentó una actividad específica de 50 UI/mg, velocidad de reacción de 200 $\mu\text{mol/min}$ y Km de 100 mg/L. Las actividades enzimáticas de la papaína inmovilizada sobre sílica, tierra de diatomeas y alúmina fueron 6,36; 5,74 y 2,42 UI respectivamente a pH 7,5 y 30 °C. En estas condiciones, la papaína inmovilizada sobre tierra de diatomeas presentó menor actividad catalítica en comparación con sílica.

Palabras clave:

Carica papaya, papaína, inmovilización enzimática, tierra de diatomeas, sílica

SUMMARY

The objective of the study was to immobilize the papain from the latex of *Carica papaya* "papaya" on diatomaceous earth from the Vista Alegre mines from El Carmen Alto district, Huamanga. For this, the latex was collected from the green fruits of *Carica papaya*, from the San Francisco district at 600 m altitude, La Mar (Ayacucho). Then, the latex was stabilized with 100 mM phosphate buffer at pH 7.5 and lyophilized. On the other hand, 0.1% (w/v) papain was immobilized by adsorption on diatomaceous earth, silica and alumina at 180 min; the immobilization index was 95.44%; 97.26% and 15.16% respectively. The enzymatic activity conditions were pH 7.5 at 30 °C and 30 min, using bovine serum albumin as a substrate; protein concentration was determined by Lowry's method. Thus, soluble papain presented a specific activity of 50 IU / mg, reaction rate of 200 $\mu\text{mol}/\text{min}$ and K_m of 100 mg/L. The enzymatic activities of immobilized papain on silica, diatomaceous earth and alumina were 6.36; 5.74 and 2.42 IU respectively at pH 7.5 and 30 °C. Under these conditions, immobilized papain on diatomaceous earth presented lower catalytic activity compared to silica.

Keywords:

Carica papaya, papain, enzymatic immobilization, diatomaceous earth, silica.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Situación problemática

En estos años, la ingeniería de enzimas ha realizado grandes avances al igual que sus aplicaciones en el uso de las enzimas inmovilizadas para las industrias: de alimentos, farmacéutica, peletera, detergentes, papelera, textil, entre otras. A la vez, los métodos de biocatálisis por enzimas en la industria prontamente se incrementan, ya que muestran ventajas con relación a los catalizadores no biológicos. Los procesos catalíticos tradicionales emplean químicos que contaminan el ambiente y, tienen baja selectividad.

La búsqueda de potenciales biocatalizadores que sean inocuos con el ambiente, económicamente accesibles y con rendimientos similares a los ya existentes, es de gran interés. En este aspecto, la papaína es una candidata obtenida del látex de *Carica papaya*, “papaya”. Sin embargo, algunos factores limitantes para el suministro de la papaína de forma sostenible son la alta dependencia del clima, así como de las políticas y la economía de los países productores.

Por ello, la inmovilización de enzimas, sobre todo en la industria de los alimentos, es una práctica permanente, con el fin de mejorar los bioprocesos y disminuir los costos de producción. Así, Cortes, y col, (2008) mencionan la inmovilización de lipasas para la producción de compuestos estéricos de grasas que tienen interés por sus propiedades emulsificadoras.

El boletín del programa de Producción de exportaciones agrícolas no tradicionales (PROEXANT), señala que se producen mundialmente 300 000 TM de agentes con actividad superficial que pueden ser utilizados en el procesamiento de alimentos mediante inmovilización de enzimas (PROEXANT, 2005).

En la inmovilización de enzimas se han realizado distintos procesos, así, la papaína conocida por su actividad hidrolítica sobre las proteínas alimenticias y en procesos tecnológicos como agente de clarificación durante la elaboración de la cerveza, el ablandamiento de la carne, entre otros. Asimismo, la papaína selizada es usada en problemas digestivos y como antihelmíntico (Wiseman, 1991), por lo cual se considera un modelo para comparar la eficacia de los procedimientos de inmovilización utilizando diversos soportes.

Las aplicaciones industriales de la papaína inmovilizada son la síntesis de ésteres, péptidos y aminoácidos dependiendo del solvente de reacción. Sin embargo, la papaína libre (sin inmovilizar) principalmente se utiliza en la hidrólisis de las proteínas para producir péptidos y aminoácido. Así, la papaína inmovilizada en sefarosa facilitada por iones metálicos presenta alta actividad y termoestabilidad durante cuatro ciclos de reacción (Afaq, 2001).

Viviane y col. (2008), presentan un estudio comparativo de la inmovilización de pancreatina y papaína sobre carbón activado y alúmina utilizando como sustratos diversas proteínas. De esta forma, obtuvieron hidrolizados proteicos para uso como suplementos dietarios. concluyen que el tipo de soporte afecta la actividad de las enzimas.

Así mismo, Biasutti *et al*, con la finalidad de obtener suplementos nutricios de bajo costo, inmovilizaron papaína en carbón activado (CA) y en alúmina (AL), utilizando el suero como sustrato. Ellos determinaron el índice de inmovilización, las condiciones óptimas de inmovilización, la capacidad de reutilización y la actividad enzimática. En este caso, la AL presentó mejores resultados que el CA (Biasutti, 2006).

1.2. Formulación del problema

Las enzimas son catalizadores biológicos, es decir, proteínas que tienen la capacidad de acelerar las reacciones químicas. La utilización de enzimas en la industria ha adquirido gran relevancia para el desarrollo de nuevos procesos y productos.

La tecnología de enzimas presenta avances significativos, con respecto a la inmovilización de enzimas para su aplicación en las industrias farmacéutica, médica, alimentaria, cosmética, agropecuaria, papelera, panadería, cervecera, bio-tratamiento, producción de detergentes, entre otras.

La producción de papaya en las regiones selváticas del país es abundante; sin embargo, existen pocas iniciativas para el mejor aprovechamiento tanto del fruto como del látex e incrementar mayor rentabilidad para los agricultores y las zonas productoras.

La extracción de la papaína, y mejoras de la purificación e inmovilización constituyen alternativas viables para dar valor a este recurso vegetal abundante. Lo cual, impactaría favorablemente en los productores e industrias agroalimentarias, pecuarias, entre otras (Arroyo, 2010).

Por ello, la inmovilización de la papaína, proveniente del látex de los frutos de *Carica papaya* L “papaya” en tierras de diatomeas es una alternativa con potenciales aplicaciones industriales, y rentabilidad en procesos prospectivos, lo cual reducirá los costos del proceso catalítico en la obtención de productos seguros para su consumo como hidrolizados proteicos y aminoácidos. En este contexto surge la siguiente interrogante: ¿Será posible la inmovilización de papaína obtenida de los frutos de *Carica papaya* sobre tierra de diatomeas?.

1.3. Justificación teórica

La inmovilización de enzimas, hoy en día, es una práctica común, con éxitos en los procesos catalíticos para la obtención de nuevos productos, sobre todo en las industrias alimentaria, farmacéutica, investigación tecnológica, entre otras.

Como consecuencia del desarrollo de la biotecnología y la tendencia de usar procesos limpios y sostenibles para la obtención de productos, se requiere el uso de los catalizadores biológicos. En este aspecto, las enzimas poseen muchas ventajas con respecto a los químicos entre ellas, presentan actividad en un amplio rango de

temperaturas y pH, así como gran especificidad por un sustrato (Casablancas, 1998 y Bu'lock, 1991)

Por otro lado, la dificultad que se presentan en los procesos industriales en la separación de sustratos y productos, que son hidrosolubles, hace que las enzimas sean no reutilizables. Por ello, se realizó la inmovilización de la papaína a un soporte inerte como es la tierra de diatomeas procedentes de Huamanga (Ayacucho), para obtener un recurso tecnológico con insumos locales, el cual es escalable a nivel industrial.

1.4. Justificación práctica

La papaína inmovilizada en tierra de diatomeas, material inerte e insoluble permitirá mejorar sus propiedades catalíticas y resistencia a cambios de la temperatura, el pH. A la vez, permite la reutilización de la papaína por varios ciclos de reacción, así como separar los productos; en consecuencia, el proceso catalítico es más eficiente y rentable. De igual forma, este desarrollo tecnológico es aplicable a otras enzimas utilizando soportes inorgánicos, orgánicos, entre otros (Clapés y col., 1989).

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general

Inmovilizar papaína a partir de los frutos de *Carica papaya* “papaya”, en tierra de diatomeas.

1.5.2. Objetivos específicos

1. Aislar la papaína a partir de los frutos de *Carica papaya* y determinar su actividad.
2. Inmovilizar la papaína en tierra de diatomeas y determinar su actividad.
3. Comparar la actividad de la papaína inmovilizada sobre otros soportes poliméricos.

CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

2.1. Marco filosófico epistemológico de la investigación

Si bien es cierto que la bibliografía nos presenta una serie de datos importantes que han consolidado las ciencias bioquímicas, como un pilar fundamental en su relación con otras ciencias, como la enzimología, conjuntamente con los avances tecnológico, científicos, y el conocimiento de la materia a escala de partículas elementales, han permitido también el desarrollo de la genética, metabolismo y biotecnología como herramientas científico-tecnológicas en el avance de la investigación (Valbuena, 2010).

En el proceso histórico del conocimiento, los intelectuales y pensadores han logrado resumir la esencia dialéctica del conocimiento. Así, Platón, Heráclito, Aristóteles, Hegel, Popper, Khun y otros coincidiendo que en mundo es un flujo dinámico en constante movimiento, capaz de presentar y desarrollar nuevas teorías y respuestas a las hipótesis planteadas respecto a una curiosidad científica, sin embargo, no todos sabemos preciar la educación, cuando es capaz de formar y crear un nuevo ser humano que sea capaz de aprovechar los conocimientos y enfrentar con fundamento y decisión las situaciones que se presenten como problemas científicos, que deberán ser resueltos en pro del bienestar del hombre, conocimientos que finalmente pueden marcar un hito en la concepción y comprensión del conocimiento, de las nuevas disciplinas, producto de la interacción de las ciencias en su conjunto (Martínez, 1996).

La fenomenología es una de las corrientes filosóficas que se encarga de guiarnos en el conocimiento de los objetos y fenómenos presentados en la realidad a fin de alcanzar una comprensión más fiable de los conceptos, leyes y propiedades particulares que se modifican en cada objeto, y que constituyen la base de la observación y el método científico, encaminando el incremento del conocimiento.

Consideramos que es necesario remarcar que la enzimología, como ciencia derivada de la bioquímica se encarga del estudio de los catalizadores de origen biológico, o biocatalizadores, sus funciones en los procesos de reacción bioquímica, la especificidad frente al sustrato, y las condiciones dentro de las cuales se lleva a cabo el fenómeno bioquímico, entre alguna de sus aplicaciones.

El conocimiento de la bioquímica por otra parte, nos enseña que, dentro de las células, los procesos de transformación están mediados por la presencia y acción enzimática, todas muy complejas, debido a la simultaneidad de los procesos y la cantidad y diversidad de productos formados y obtenidos. Tales moléculas también tienen distintas actividades en el organismo y fuera de él, de ahí la importancia en el conocimiento de las enzimas con capacidad de biocatalizar procesos *in vitro*, con la utilización de macromoléculas biológicas como sustratos para la formación de productos específicos de reacciones de conversión bioquímica, resulta por ello que un proceso bioquímico consta de etapas (Federico, 2009).

2.2. Antecedentes de la investigación

En nuestro país y en el extranjero, los estudios sobre la papaína de *Carica papaya* “papaya”, son amplios como insumo de aplicación a nivel alimentaria y médica. Asimismo, se han realizado investigaciones de las actividades farmacológicas de *Carica quercifolia* St. Hill “gargatea, relacionada con el género *Carica* (Burdick, 1971).

Los vegetales, proporcionan numerosas moléculas, muchas de ellas contienen nitrógeno, importantes desde el punto de vista farmacológico, como son los alcaloides, flavonoides; así como péptidos y proteínas, que proporcionan aminoácidos, péptidos, entre otros (Carretero, 2000).

Muchos aminoácidos que están presentes en los vegetales son esenciales, para la formación de péptidos y proteínas, los cuales cumplen diversas funciones como es el caso de la enzimas, las cuales son clave en las vías metabólicas de la planta. A la vez, estas proteínas catalíticas pueden presentar actividad *in vitro* sobre sustratos análogos,

siempre y cuando tengan las condiciones óptimas de reacción adecuadas.

La bromelina, la ficina y la papaína, enzimas de origen vegetal, son las más estudiada en el campo de la terapia, la bioquímica y los procesos industriales, los frutos como la piña, el higo y la papaya presentan alto contenido de estas enzimas respectivamente (Udod, 1983; Howart, 1972).

Con referencia a la inmovilización de papaína se utilizó los soportes alúmina y carbón activado con el objetivo de utilizar la papaína inmovilizada para la obtención de hidrolizados proteicos a partir de suero de leche. Para ello, se determinó el índice de inmovilización por cuantificación de enzima libre e inmovilizada por el método de Lowry. Las mejores condiciones de inmovilización fueron 30 min y 25° C en ambos soportes. En alúmina se obtuvo índices de inmovilización de 99%, mientras carbón activado se obtuvieron índice de inmovilización de 95% y la actividad residual se calculó luego de veinte ciclos de reacción (Biasutti, 2009).

Silva (2007) inmoviliza por adsorción papaína y pancreatina en carbón activado y alúmina. El grado de inmovilización fue determinado por cuantificación de la enzima no ligada, y éste depende directamente del soporte utilizado para este propósito. Los resultados indican que la enzima se inmovilizó mejor en carbón activado que en alúmina a 30 min y 25 °C. Sin embargo, la papaína inmovilizada en alúmina demostró mejor actividad catalítica luego de varios ciclos de reutilización (Silva, 2007).

Los trabajos publicados respecto de la digestión de inmunoglobulinas G humanas con papaína, contemplan el estudio a nivel bioquímico e inmunológico con relevancia científica, así, Mihaesco & Seligmann,(2006) demostraron que la papaína activada produce pequeños péptidos, un fragmento con características fisicoquímicas e inmunológicas análogas a las del fragmento grande de IgG y uno pequeño unido por enlaces disulfuro.

Los estudios de desnaturalización de la papaína también fueron realizados por Zhuang & Butterfield (2008), reportaron que el sitio activo de la papaína es estable en solución de urea, pero inestable en clorhidrato de guanidina. Los resultados de resonancia

magnética de electrones y espectroscopía de fluorescencia evidenciaron cambio de pH y posiblemente su desnaturalización.

Un método presentado por Afaq & Iqbal, (2001) para la inmovilización de la papaína se basó en la interacción entre histidina, cisteína y residuos del triptófano con un soporte iónico que inmoviliza a la enzima. La alta actividad de la papaína inmovilizada se mejoró, así como la estabilidad térmica, se podía recuperar la actividad de la enzima durante cuatro ciclos de reacción.

2.3. Bases teóricas

2.3.1 Aspectos botánicos de las *caricaceae*

Ramírez (1998) describe a esta Familia como árboles que algunos individuos presentan en su disposición órganos sexuales masculinos y femeninos en una sola planta (monoicos), y otros que cada individuo presenta la disposición de un solo órgano sexual (dioicos) el tallo es poco fibroso, con un parénquima poroso, con abundante presencia de agua, de corteza lisa, hojas palmeadas, las inflorescencias se encuentran de forma axilar en una disposición de panículas. Por su parte, las flores son unisexuales, que presentan un cáliz con cinco pétalos, la corola es tubi-floral, dentro de ella se contiene 10 estambres, el fruto es una baya que se compone de pericarpio divididos en planos con sub-unidades llamadas lactíferos que se originan en el tejido esponjoso, dispuestas por debajo de la epidermis.

El género *Carica* pertenece a la familia CARICACEAE del orden PARIETALES y la subclase ARCHYCLAMIEAS, comprende 30 especies y 04 géneros, distribuidos a lo largo del Continente Americano en las zonas tropicales, abarcando territorialmente desde el norte de México hasta la Argentina, e incluyen las principales especies de distribución tropical y sub tropical y son:

Carica goudotiana

Carica pubescens

Carica quercifolia

Carica heilbornii

Carica cauliflora

Carica papaya L (Ramírez, 1998).

En Perú existen cerca de 10 mil hectáreas de cultivo de papaya, siendo las principales regiones productoras Ucayali (5 mil Has), San Martín, Madre de Dios, Cusco, la selva de Ayacucho, Huancavelica, Junín, Loreto y la zona interandina de Apurímac. Además en Piura y Chiclayo se está intentando sembrar.

El rendimiento nacional es de 40 toneladas por Has., por otro lado. los principales países productores de papaya son Brasil, Colombia, Ecuador, Costa Rica y Honduras, mientras que los países consumidores son Estados Unidos, China y Europa. Perú exporta papaya en pequeños volúmenes hacia Chile y Canadá (Ministerio de Agricultura, 2010).

2.3.2 Clasificación taxonómica

Según el sistema de clasificación de Engler y Prantl, modificado por Melchior la especie se ubica en la siguiente categoría taxonómica

DIVISIÓN	:	ANTOPHYTA (ANGIOSPERMAE)
CLASE	:	DICOTILEDÓNEA
SUBCLASE	:	ARCHYCLAMIDEAS
ORDEN	:	PARIETALES
FAMILIA	:	CARICACEAE
GENERO	:	CARICA
ESPECIE	:	<i>Carica papaya</i> L
N.V.	:	“papaya”

2.3.3 Aspectos químicos de la familia Caricaceae

La familia CARICACEAE presenta la siguiente composición química: carotenoides, saponinas, flavonoides, papaína, carpaína, carpasemina, quimo papaína, pectina, ácidos grasos, y otras sustancias (PROEXANT, 2005).

La incisión sobre el fruto da lugar a la emanación de una sustancia viscosa y lechosa denominada papaína, y cuando éste se deseca da lugar a la papaína bruta o base, que composicionalmente es una mezcla de enzimas hidrolíticas y proteolíticas, como

polipéptidos de cadena simple, aminoácidos y cistein proteasa o más específicamente papaína, la cual posee aproximadamente 212 aminoácidos, es termoestable y tiene una efectividad a un pH promedio de 6. La quimo papaína es otro de los compuestos presentes en el látex, tiene aproximadamente 218 aminoácidos, y sus actividades son similares a la papaína, un poco menos termoestable pero proteolíticamente semejante (Ramírez, 1999).

2.3.4. Bioquímica de la papaína

De los datos tomados del Protein Data Bank, se puede extraer lo siguiente:

2.3.4.1. Clasificación. El sistema de clasificación enzimática señala que la papaína, es una cisteína proteasa, EC 3.4.22.2; pertenece a una familia de proteínas relacionadas con una gran variedad de actividades, incluyendo las endopeptidasas, y aminopeptidasas.

Las cisteín proteasas son extensas, se encuentran desde los baculovirus, levaduras, y prácticamente todos los protozoos, plantas y mamíferos, pero se prefiere el uso de los que provienen de vegetales por razones de salubridad.

2.3.4.2. Mecanismo catalítico. El primer paso en el mecanismo de la reacción por el cual las proteasas catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos es la desprotonación de un grupo tiol en el sitio activo de la enzima al lado de un aminoácido adyacente con una cadena lateral básica, generalmente un residuo de la histidina (JagnoW, 1991).

El paso siguiente es ataque nucleofílico al lado del sulfuro aniónico de la cisteína desprotonada contra el carbón del grupo carbonilo del sustrato. El enlace tioéster se hidroliza posteriormente para generar una mitad del ácido carboxílico en el fragmento restante del sustrato, mientras que regenera la enzima libre, tal como se observa en la figura 1.

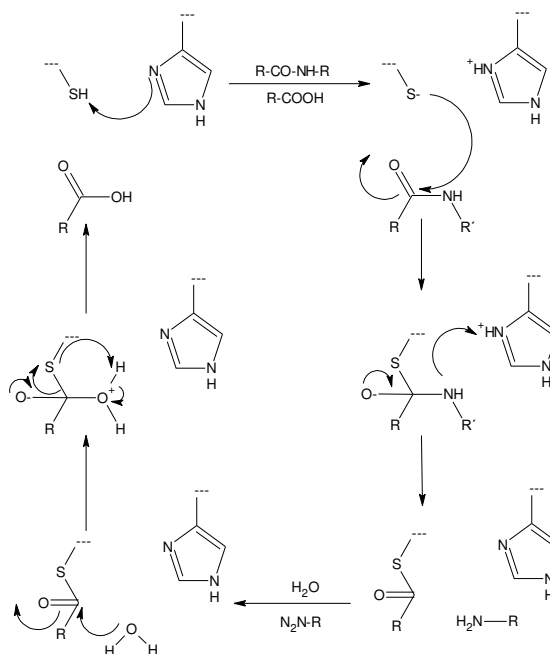


Figura 1. Esquema del mecanismo catalítico de la papaína (Grudkowska y Zagdańska, 2004).

2.3.4.3. Estructura. La proteína precursora de la papaína contiene 343 residuos de aminoácidos, y se compone de una secuencia señal, un pro péptido y el péptido maduro. El número de aminoácidos se basa en el péptido maduro. La proteína está estabilizada por tres puentes disulfuro. Su estructura tridimensional se compone de dos dominios estructurales distintos, con una hendidura entre ellas (Figura 2). Esta hendidura contiene el sitio activo, con una díada catalítica que ha sido comparado con la tríada de la quimotripsina. La díada catalítica se compone de los aminoácidos cisteína 25 e histidina 159. La papaína es una enzima relativamente resistente al calor, con un rango de temperatura óptima de 60 a 70°C (Martinez y col, 2002).



Figura 2. Estructura cristalina de la papaína (cisteína peptidasa) en complejo con un inhibidor. Diseñado por PDB (PROTEIN DATA BANK, 2008)

2.3.4.4. Usos de la papaína en la industria. López, Díaz y Merino (1996), señalan que la bromelina como la papaína, a nivel industrial tiene muchas aplicaciones, como en la industria del procesamiento de las carnes, cervecería como clarificante por sus propiedades de reducir la formación de sedimentos, producto de la ruptura celular; así como en las industrias de los alimentos, farmacéutica, química, entre otras.

2.3.4.5. Aplicación biotecnológica de la papaína. El comercio del látex de la papaya a nivel mundial representa un valor de aproximadamente cien millones de dólares por año, teniendo mayor demanda las industrias alimentarias, específicamente en la obtención de alimentos semi digeridos, sin exceptuar los usos en la industria cosmética y farmacéutica, además de sus aplicaciones médicas en dermatología, como agentes despigmentantes, en estos tres últimos la demanda es del 10% de la producción. Mención a parte es la utilización de la papaína como un tratamiento alternativo antimicótico, ya que se ha demostrado que las cistein proteasas de la papaína tienen actividad sobre *Candida albicans*, así como de poseer efecto antiinflamatorio. Investigaciones recientes versan sobre la posible utilización como una fuente para la obtención de biopolímeros biodegradables, y en la industria bioquímica como aditivo para la producción de oleorresinas de baja densidad y toxicidad (Ramírez, 1999).

2.3.4.6. Biocomercio de la papaína. El biocomercio ha despertado grandemente el interés por la comercialización de los productos provenientes de fuentes naturales a partir de 1990, promueve la investigación de los recursos biológicos, para profundizar los procesos de desarrollo según los tres objetivos principales del Convenio de Diversidad Biológica, en el marco del estudio de recursos vegetales emergentes, con potencialidades económicas y sus posibilidades de industrialización.

- a) La conservación de los recursos naturales,
- b) El uso equilibrado y sostenible de los recursos naturales
- c) Participación igualitaria de lo de los beneficios de la explotación de los recursos naturales.

Actualmente, los objetivos del biocomercio están centrados básicamente en la promoción del uso de manera responsable y sostenida de los recursos naturales que generen beneficios en la población y desarrollo económico para los países que están inmersos en su explotación, de tal manera que sean competitivos en los nuevos mercados de productos provenientes de la diversidad nativa con base en el respeto de ecosistemas y especies.

La demanda mundial de la papaína se presenta en la siguiente tabla.

Tabla 1. Usos industriales y artesanales de la papaína.

Localización geográfica	Usos	Consumo (Ton)
Europa	Clarificador de cerveza	120
	Industria de Punta	20
	Otros usos	20
Usa	Clarificador de cerveza	180
	Ablandador de carnes	160
	Industria e punta	30
	Otros usos	30
Japón	Clarificador de cerveza	80
	Industria de Punta	40
	Otros usos	20
Latinoamérica y otros países	Clarificador de cerveza	100
	Ablandador de carnes	100
	Otros usos	20

Fuente: Datos tomados de Fernández (2005)

En el Perú, en los últimos años, se han identificado productos cultivables que no estaban siendo bien aprovechados, y que fueron considerados en algún momento como productos no comerciales, y que hoy en día son apreciados no sólo en estas latitudes, si no a nivel mundial por su capacidad y calidad de contenido alimentario, una tendencia que se refleja en la explotación y utilización de los productos nativos, sin embargo, no existe una oferta para homogenizar los productos cultivables

generalmente por el desconocimiento de las virtudes de éstos productos. el contexto peruano, se identifica a los cultivos subutilizados con aquellas (Pastor, 2006).

2.4. Inmovilización de enzimas

La tecnología de la inmovilización de enzimas es muy importante para las industrias de los alimentos, textil, cervecera, cárnica, bioquímica, química, farmacéutica y médica. Los procesos bioquímicos mediados por enzimas tienen muchas ventajas respecto a la utilización de otros productos químicos que utilizan la catálisis (Magner, 2013):

- a) Poseen una fuerte y marcada actividad catalítica
 - b) Tienen propiedades de especificidad frente a un sustrato
 - c) Se caracterizan por ser muy estables en condiciones variadas de temperatura y pH.
- No obstante, la utilización de enzimas en procesos productivos industriales no se ha masificado, posiblemente debido a la especificidad de la aplicación sobre el sustrato, y la desventaja de separación de los sustratos y productos. Sin embargo, la inmovilización enzimática permite una aplicación biotecnológica rentable y sostenible (Trevan, y col., 1990).

2.4.1. Características de la inmovilización de enzimas

El proceso de inmovilización de enzimas, es una técnica en la que se atrapa una enzima en un soporte generalmente sólido, de naturaleza compatible e inerte para la actividad enzimática, es decir no representa peligro en la disminución de la actividad de la enzima, y que por lo tanto se saca provecho por la capacidad de reutilización.

De otro modo, el proceso de inmovilización de enzimas, ha ido escalando a moléculas cada vez más grandes y complejas, como el atrapamiento de orgánulos, células, por unión compatible a un soporte.

Este proceso de inmovilización, tiene muchas ventajas, dentro de las que podemos mencionar:

- a) Incremento de la estabilidad en la actividad enzimática.
- b) Reutilización de la enzima inmovilizada y disminución de los costos de producción
- c) Facilidad en el manejo de proceso de la enzima inmovilizada
- d) Recuperación rápida del producto obtenido

Sin embargo, este proceso de utilización de enzimas inmovilizadas presenta algunos inconvenientes, con respecto a las ventajas, que se pueden superar con mayor desarrollo tecnológico:

- a) Cambio en la conformación estérica de la enzima con relación a su estructura inicial, que no afecta en gran medida el rendimiento de la actividad enzimática
- b) Elección del soporte adecuado para la inmovilización y afinidad por el atrapamiento (Montes y Magaña, 2002).

2.4.2. Métodos de inmovilización física de enzimas

2.4.2.1 Atrapamiento. Es un proceso físico de atrapamiento o retención de una biomolécula con actividad catalítica en un soporte sólido, que en su conformación presenta espacios intermoleculares, donde se fija la enzima, este material de soporte por lo general son polímeros o sales neutras, que poseen resistencia al flujo, impidiendo la liberación de la enzima.

La retención de una enzima por un soporte insoluble es el método que tiene mayor aplicación, así como el más investigado, estas proteínas con actividad catalítica actúan sobre diversos sustratos a diferentes condiciones de reacción. Para el atrapamiento enzimático, se disponen de diversos soportes insolubles, que pueden ser inorgánicos, orgánicos de origen natural y sintéticos.

La inmovilización de enzimas se clasifica respecto a la forma, y método de unión, que puede ser por sus propiedades físicas, como la adsorción, la conjugación iónica, la quelación metálica y covalente, en cualesquiera de los métodos, el soporte deberá ser siempre insoluble.

2.4.2.2. Inclusión en membranas. Los procesos incluyen:

Microencapsulado. Éste método de inmovilización se fundamenta en la inmovilización de la enzima en membranas de naturaleza polimérica semipermeables,,

de tamaño de partículas de 100 μ , en este proceso, las enzimas inmovilizadas, están dentro de la membrana y el sustrato debe ser difundido a través de ella para conseguir la formación del producto, el orden de tamaño del sustrato por tanto será de entre 0.1 μ a 50 μ , por otra parte, el micro encapsulado, necesita altas concentraciones de enzima, debido a la posible inactivación que puedan sufrir en el proceso de adsorción, la ventaja adicional de éste método es la gran superficie de contacto que presenta el sustrato en relación a la enzima y la posibilidad de retener por este mismo proceso varias enzimas (Wiseman, 1991).

Reactores de membrana. El método de atrapamiento en reactores de membrana o en geles, tiene su fundamento en la ubicación de las enzimas en los espacios intercelulares o intermoleculares de los geles, poliméricos que no presentan solubilidad alguna en agua, el proceso es básicamente una oclusión utilizando soportes sintéticos de origen orgánico y la forma más sencilla consiste en la polimerización de acrilamida en una solución acuosa de la enzima. Otra forma de retención de las enzimas es el entrecruzamiento, una técnica de atrapamiento empleada por Bernfeld y Wan, en la que inmovilizó tripsina (EC 3.4.21.1), β amilasa (EC 3.2.1.2), papaína (EC 3.4.22.2) con un agente de entrecruzamiento N, N metilacrilamida (Medeiros y col., 2008),

2.4.3. Inmovilización de enzimas por afinidad química

2.4.3.1 Unión a soportes. Se basa en la unión iónica de las enzimas a soportes sólidos que en su estructura tienen grupos cambiadores de iones y que debido a la naturaleza iónica de las fuerzas de enlace, , en algunos casos se puede producir la liberación de la enzima al igual que en la adsorción física, sobre todo cuando se utilizan concentraciones superiores de sustrato respecto a la enzima, o soluciones con cargas iónicas altas, que producen cambios de pH, son capaces de desprender a las enzimas de su soporte. La primera enzima inmovilizada por este método fue la catalasa (EC 1.11.1.6) en DEAE celulosa, y la primera aplicación industrial de enzimas inmovilizados por este método se usó la aminoacilasa (EC 3.5.1.14), inmovilizada en DEAE Sephadex, con el objetivo de obtener aminoácidos a partir de N-acetil DL aminoácidos (Wiseman, 1991).

Adsorción. Es una técnica que se utilizó como el primer método artificial para la inmovilización de las enzimas con fines de investigación y producción, Nelson y Griffin inmovilizaron por éste método la enzima β -D-fructofuranosidasa (EC 3.2.1.26) en hidróxido de aluminio, éste método es el más simple entre todos, y la enzima se une al soporte por electrodeposición, procedimiento estático baño con agitación o proceso en reactor, esta última la más utilizada en los laboratorios, en la que el soporte se coloca en la solución de la enzima y se mezcla mediante agitación continua en baño.

Uno de los principales factores que influyen en la cantidad de enzimas que se pueden adsorber a un medio o soporte sólido es la cantidad de enzima en relaciones de concentración por superficie de soporte sólido durante la etapa de inmovilización. La actividad aumenta al incrementar la concentración de la enzima y es próxima a la saturación asintóticamente a concentraciones superiores y elevadas de enzima.

Unión covalente. Estos métodos tienen su fundamento en la unión covalente de la enzima a soportes que tiene la característica de ser insolubles en agua, y se encuentran dentro de los procedimientos más utilizados e investigados en la inmovilización de enzimas.

La selección de las condiciones de inmovilización se da por medio de la conjugación de enlaces covalentes y el manejo de este proceso es más complejo, que requieren condiciones más específicas que otros métodos, pero una vez formados los enlaces de unión covalente entre la enzima y el soporte, cumplen su proceso, y son más tolerantes a medios de alta concentración iónica.

El proceso de inmovilización de una enzima mediante enlaces covalentes a la matriz o soporte, debe englobar solo a grupos funcionales de la enzima que no sean esenciales para el cumplimiento de su actividad de catálisis, por lo que se restringe el uso de otros compuestos que actúen sobre el centro activo de la enzima.

Para conseguir una mayor actividad en la preparación de la enzima inmovilizada, resultante, previniendo la inactivación de la reacción con los restos de aminoácidos

esenciales del centro activo, se han diseñado una serie de métodos entre los que se mencionan:

- a) Enlace covalente de la enzima en presencia de un sustrato o un inhibidor competitivo
- b) Enlace de un complejo enzima-inhibidor formado mediante un enlace covalente reversible
- c) Uso de una enzima soluble modificada químicamente de forma que el enlace covalente a la matriz se lleve a cabo mediante los residuos nuevos incorporados
- d) Uso de zimógeno precursor.

Quelación. Es un método reciente, que se fundamenta en el uso de metales de transición como una manera de activar la superficie del soporte, esta técnica permite la unión directa de la enzima sin transformación química alguna de la matriz, a través de la formación de quelatos o complejos.

Entre estos soportes se encuentran el vidrio, la quitina, el ácido algínico, la gelatina, los ácidos acrilaminosalicílicos, la celulosa entre otros. También se puede obtener hidróxidos u óxidos hidratados de los metales de transición en presencia o inmediatamente antes del contacto de la molécula utilizada en la inmovilización, estos soportes se usan para la inmovilización de aminoácidos, péptidos, proteínas, enzimas, carbohidratos y antibióticos, entre los metales utilizados para este proceso se consideran el Zirconio IV, el Titanio III y IV que son capaces de formar hidróxidos y óxidos poliméricos.

Algunos investigadores describen este proceso como parcialmente covalente, cabe señalar que se puede producir la desorción, al igual que en muchos otros procesos de inmovilización, incluso en los enlazados de manera covalente, sobre todo cuando se almacena por largos periodos.

Reticulado. Es un proceso de entrecruzamiento, en la que se utilizan compuestos químicos que brindan grupos funcionales capaces de acoplarse de manera covalente o susceptibles de ser activados para dar tales grupos, por ello se hace de éste un método de inmovilización con aplicación general.

No obstante, la complejidad estructural y de composición de las proteínas no ha permitido, excepto en un número muy limitado de casos la aplicación de reglas generales que permitan predecir el método más adecuado para un trabajo concreto (Wiseman, 1991).

2.5. Aplicaciones de las enzimas inmovilizadas

Se pueden clasificar en:

Analíticas

Médico - Terapéuticas

Industriales

2.5.1. Biosensores

Los nuevos avances recientes en el campo de la tecnología de inmovilización junto con las potenciales aplicaciones analíticas han conducido a la aparición de varios sistemas disponibles comercialmente.

Los biosensores, como electrodos enzimáticos, aunque poco se han desarrollado en una extensión tal que sean de uso común o estén disponibles comercialmente, hoy en día existen electrodos de D-glucosa-oxidasa, (EC 1.1.3.4) que se inmoviliza en un gel de poliacrilamida y se mantiene alrededor de un electrodo de oxígeno mediante una porción de acetato de celulosa, esta cataliza la reacción de conversión de la β -D glucosa más oxígeno a D-glucono-1,5-lactona y peróxido de hidrógeno, el electrodo de oxígeno mide la pérdida de oxígeno de la solución que se produce a una velocidad que depende de la concentración de D-glucosa presente.

Dado que se dispone comercialmente de electrodos de oxígeno, este electrodo enzimático es muy barato y fácil de preparar y es un método simple para la determinación específica de la D-glucosa en solución, particularmente en las soluciones particuladas u opacas.

2.5.1.1. Aplicaciones de los biosensores. Hay dos áreas del análisis automático en la que se utilizan enzimas inmovilizadas, por ejemplo, en el análisis automático de

marcadores bioquímicos que se encuentran en la sangre, los analizadores automáticos (AutoAnalyzer) incorporados en equipos tecnológicos, facilitan la tarea de la cuantificación de moléculas de interés clínico, así también se han desarrollado detectores de compuestos, acoplados a biosensores, como es la cuantificación de oxígeno en acuíferos por ejemplo (DBO), analizadores de la presencia de gases como monóxido y dióxido de carbono (enzimas carboxilasas empaquetadas en soportes). Adicionalmente se mencionan el desarrollo de las pruebas de identificación rápida por acción enzimática, como las tiras reactivas, impregnadas con enzimas y cromógenos para la determinación rápida de diagnóstico.

2.5.2. Aplicaciones médicas

La terapia enzimática difiere del reemplazamiento de enzimas en la que la enzima a añadir al cuerpo no se encuentra normalmente en él o no ha disminuido patológicamente en cantidad, estas enzimas se utilizan para alterar las condiciones medioambientales normales del cuerpo para controlar una enfermedad, por ejemplo el uso de L-asparaginasa (EC 3.5.1.1) utilizada para tratar algunos tipos de leucemias, con la consecuente eliminación del ácido aspártico de la sangre, la enzima se administra en forma inmovilizada y biodegradable como por ejemplo en cápsulas de ácido poliláctico (Billigmann, 1995; Stone y col., 2002).

Existen otras enfermedades que se presentan por la inexistencia de enzimas, posiblemente por desordenes genéticos, y que ocasionan patologías recurrentes, estas pueden controlarse administrando enzimas específicas que suplen la ausencia, restableciendo el orden orgánico.

2.5.3. Aplicaciones en la industria farmacéutica

La mayoría de las aplicaciones industriales propuestas implican el uso de las hidrolasas, debido a que son mucho más estables y funcionan sin la presencia de coenzimas, los principales campos de aplicación son industria farmacéutica, y alimentaria, aunque otras áreas potenciales incluyen el tratamiento de desechos, la biorremediación, la producción de L-aminoácidos, mediante la resolución óptica de los acetil DL-aminoácidos utilizando aminociclasa (EC 3.5.1.14) inmovilizada, la producción de jarabes ricos en fructosa utilizando D-glucosa isomerasa (EC 5.3.1.5)

y la producción de ácido 6 aminopenicilánico utilizando penicillium amidasa (EC 3.5.1.11) Gasesa y Hubble, 1990).

Estos procesos tienen ventajas, como la producción específica de una molécula mediada por una enzima, mientras que la desventaja es que son procesos relativamente caros (Crueger, 1993).

2.5.3.1. Obtención de antibióticos β -lactámicos. La producción de antibióticos B-lactámicos, como las penicilinas y las cefalosporinas en la industria farmacéutica se dan en procesos óptimos, con la utilización de las enzimas extraídas e inmovilizadas de microorganismos del género *Penicillium*, la enzima implicada es la penicilina transacetilasa.

De la misma manera, hoy en día son muchos los antibióticos que se obtienen por el concurso de enzimas inmovilizadas, sobre todo los producidos alternativamente a partir de microorganismos como aminoglucósidos, N-glicósidos, C-glicósidos, Tetraciclinas, Antibióticos peptídicos, cromopéptidos, antibióticos nucleosídicos, entre otros.

2.5.3.2. Obtención de fármacos ópticamente puros. Las moléculas que actúan como fármacos, dependiendo de su disposición estereo isomérica, pueden producir efectos contrarios a los de sus isómeros, incluso pueden manifestar cierta toxicidad o finalmente comportarse como antagonistas, es por ello que en la actualidad se han desarrollado procesos de interconversión de productos por vía enzimática.

La utilización de estas enzimas garantiza la obtención de moléculas regioespecíficas, que regulan la interconversión de isómeros, tal es el caso de la enzima transacetilasas, metiltransferasas, hidroximetil transferasas, y muchas otras que se encargan de la transposición de grupos funcionales en las posiciones R, S, D, o L, a fin de obtener fármacos ópticamente puros, con actividades farmacológicas que garanticen una adecuada terapia.

2.5.4. Aplicaciones en la industria alimentaria

La industria de las enzimas ha llegado a un auge en la utilización industrial sobre todo en los procesos ya comunes de la producción en la industria del almidón, específicamente debido al éxito del proceso de obtención de jarabes de glucosa con el sistema α -amilasa/aminoglucosidasa, este éxito ha continuado con la obtención de jarabes ricos en fructosa utilizando glucosa isomerasa inmovilizada.

El procesado de los polisacáridos también es una aplicación de las enzimas en la industria de los alimentos, este proceso utiliza enzimas sobre algunos cereales cerosos como el arroz, maíz y sorgo, cuyo principal componente es la amilopectina a partir del cual se pueden obtener almidón, dextrinas y glucosa. Algunas de las aplicaciones son:

2.5.4.1. En hidrólisis de proteínas. La industria alimentaria, ha utilizado las ventajas y propiedades de las enzimas para la producción de ciertos grupos alimenticios destinados a tipos de pacientes específicos, como aquellos que por patología metabólicas no pueden catabolizar la conversión de proteínas en péptidos y otras sub unidades menores, es por ellos que la utilización de proteasas e hidrolasas en la industria de los alimentos se está difundiendo a mayor escala, con esto se consigue la ruptura de los enlaces peptídicos de la cadena proteica, haciendo el producto más asimilable en términos metabólicos y alimentarios, otro proceso es la obtención de L-carnitina, un aminoácido que contribuye al metabolismo de las grasas en el interior de las células (Gustavo y col., 2008).

2.5.4.2. En hidrólisis de hidratos de carbono. EN algunos alimentos, la presencia de ciertas moléculas o grupos alimentarios, que pueden ocasionar trastornos digestivos, sobre todo, es el caso de la Lactosa, un carbohidrato presente en la leche, y que alrededor de un 40 por ciento de las personas la padecen.

La eliminación de este carbohidrato por competencia enzimática, mejora las características alimentarias y nutricionales, en este proceso se utilizan la β -galactosidasa y las lactasas, enzimas capaces de desdoblar esos carbohidratos en otros mejor asimilables, además aparte tiene la enzima glucosa isomerasa, participe en el proceso de conversión de fructosa a glucosa.

2.5.5. Aplicaciones en la industria química

Las enzimas hoy en día tienen mucho potencial para ser usados como reactivos en síntesis químicas, debido a que catalizan reacciones estereoespecíficas rápidamente en condiciones suaves y por que tienen una gran variedad de rango de sustratos con mucha precisión en las reacciones, dando lugar casi a la inexistencia de sub productos de formación.

Sin embargo, las síntesis químicas que utilizan enzimas para la conversión aun no han sido aceptados como procedimientos rutinarios en química orgánica, quizá por no estar familiarizados los químicos orgánicos del empleo de agua como solvente, especialmente cuando tienen que eliminar grandes cantidades una vez terminada la reacción.

En general, las enzimas son mucho más específicas que los reactivos químicos, estando limitada su acción a moléculas estructuralmente relacionadas, siendo además muchísimo más específicos de la reacción, sea esta una isomerización, transferencia, oxidación, reacción de condensación, o cualquier otra.

Se han utilizado en síntesis químicas asimétricas, por ejemplo en la producción de L-dopa, empleada en el tratamiento del Parkinson, se obtiene utilizando un catalizador de rodio quiral, sin embargo estas reacciones no enzimáticas son en general más difíciles de controlar y dan un rendimiento menor y menor pureza óptica que cuando se sintetizan los mismos compuestos enzimáticamente, puesto que las enzimas son compuestos que se comportan como reactivos quirales estrictos, como catalizadores asimétricos.

De otra parte, las especificidades estereoquímicas y estructurales de las enzimas necesitan estar bien documentadas antes de utilizarlos en síntesis química, ya que esta información facilita la predicción de la estructura y configuración de los productos, incluso para los sustratos no fisiológicos.

2.6. Soportes usados en la inmovilización de enzimas

Las técnicas modernas de la inmovilización de enzimas, predicen el uso de soportes para su inmovilización, en general se conceptúa como soporte a una matriz o material sólido inerte, que es capaz de atrapar por medios físicos o químicos a una macromolécula, como las enzimas, para permitir su acción catalítica en un bioproceso determinado.

Los soportes de inmovilización enzimática tienen características particulares, como tener baja reactividad frente a la presencia de las enzimas, no ser un sustrato de actividad enzimática, ser inerte y permitir la actividad catalítica de la formación de productos de interés, estables en un rango de temperatura y pH que permita el trabajo enzimático, no reactivos con los sustratos ni con los productos, generalmente se clasifican en dos grupos:

2.6.1. Soportes inorgánicos

Son aquellos que tienen naturaleza inorgánica, sin embargo, todos ellos cumplen con las características generales de los soportes, entre ellos se mencionan: bentonita, caolita, arena, magnetita, sílice, hidroxilapatita, alúmina, fosfato de calcio, celita, oxohidróxidos de metales, pumita, zirconio y titanio

2.6.2. Soportes orgánicos

Son los que en su naturaleza están compuestos de moléculas ricas en carbono, nitrógeno oxígeno e hidrógeno, también cumplen con las características que deben tener los soportes, dentro de ellos se mencionan:

Soportes orgánicos naturales: almidón, gelatina, celulosa, agarosa, colágeno, quitosano, agar, dextrano, alginato y carbón activo.

Soportes sintéticos, todos ellos de composición orgánica: Poliestireno, polímeros de ácido maleico, polímeros de acrilamida, nylon, polímeros de ácido metacrílico, copolímeros del ácido metacrílico y copolímeros del ácido maleico.

2.7. Diatomeas

La s diatomeas o tierra de diatomeas químicamente es un producto de la fosilización

de algas unicelulares acomodadas en forma de colonias, y en su contenido del exoesqueleto, presentan más del 80% dióxido de silicio, estas algas unicelulares presentan la siguiente taxonomía:

Dominio	: Eukarya
Reino	: Protista
Familia	: Orcophyta
Sub familia	: Khakista
Clase	: Diatomeae
Especie	: Bacillariophyceae

Éstos microorganismos tienen la característica de ser fotosintéticos, y se encuentran conjuntamente con el fitoplancton en forma de colonia y su distribución es muy amplia, pues se desarrolla prácticamente en cualquier acuífero y a veces en ambientes extremos de temperatura, pH y concentraciones de sal, pueden crecer en la superficie o en el fondo marino, tienen gran importancia en el proceso de cadena alimenticia marina, pues proveen un 50 por ciento de la producción en el océano, representa conjuntamente con el plancton un aporte a la vida marina en la alimentación primaria de los recursos vivos oceánicos (Round, 1990; Clapés, 1989).

2.7.1. Composición química de la tierra de diatomeas.

La tierra de diatomeas presenta en su composición elementos como el silicio, el aluminio y el calcio, en forma de sales inertes, la macro composición porcentual es la siguiente:

Oxido de Silicio IV (SiO_2) 85.56%, Oxido de Aluminio (Al_2O_3) 4.80%, Oxido de Hierro III (Fe_2O_3) 1.66%, Oxido de Calcio (CaO) 1.34% (Round, 1990).

No obstante, presenta en su composición otros elementos importantes, los cuales se detallan en la tabla 2.

Tabla 2. Composición de las diatomeas

Elemento	Cantidad	Elemento	Cantidad
Calcio	13.2 %	Mercurio	35 ppm
Aluminio	1.70 %	Zinc	32 ppm
Sodio	0.70 %	Cromo	16 ppm
Plata	0.5 %	Arsénicp	10 ppm
Potasio	0.48 %	Plomo	5 ppm
Magnesio	0.17 %	Níquel	5 ppm
Titanio	0.08 %	Cobalto	3 ppm
Fosforo	0.02 %	Selenio	1 ppm
Estroncio	750 ppm	Berilio	1 ppm
Bario	115 ppm	Cadmio	0.6 ppm
Vanadio	100 ppm	Hierro	0.6 ppm
Manganeso	38 ppm	Bismuto	0.3 ppm

Fuente: Datos tomados de Round (1990)

2.7.2. Usos de las diatomeas

2.7.2.1. Insecticida. En el uso tradicional y recientes investigaciones, se evidencia el uso de la tierra de diatomeas como insecticida, según refiere, la aplicación sobre los insectos produce una deshidratación que es la causa de la muerte del insecto, la preferencia de su uso hace referencia a que al ser un producto inocuo, no produce otras reacciones, así como su baja solubilidad hace que no produzca otros compuestos potencialmente tóxicos.

2.7.2.2. Fertilizante. Algunas especies vegetales son demandantes de minerales como el calcio, el silicio, el fierro, el potasio, el fósforo para su desarrollo, es por ello que la tierra de diatomeas, también se utiliza en el enriquecimiento del suelo, ya que en su composición se evidencia la presencia de grandes cantidades de éstos minerales.

Aunque no existen trabajos relacionado al aporte de nutrientes de este recurso, este se comercializa con ese fin.

2.7.2.3. Suplemento mineral. La riqueza mineral en la composición porcentual de la tierra de diatoméas, es propicia para su utilización como suplemento de la alimentación animal, no solo por el alto contenido de calcio, sodio, potasio y fosforo, sino por la presencia de los oligoelementos que son indispensables para el proceso metabólico en los seres vivos.

La síntesis de vitaminas en los organismos vivos depende de cantidades ínfimas de oligoelementos, como el magnesio, vanadio, cobalto, zinc y selenio (Round, 1990).

CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA

3.1. Tipo de estudio y diseño

Descriptivo

3.1.1. Universo y población

Frutos de *Carica papaya* “papaya”, procedentes del distrito de San Francisco a 600 m de altitud, provincia de La Mar, Departamento de Ayacucho.

3.1.2. Unidad de muestreo y de análisis

Frutos inmaduros de *Carica papaya* “papaya”, se recolectaron 4 meses después de la floración, durante noviembre y diciembre del 2008, entre las 8 a 10 am.

3.1.3. Tamaño muestral

Se recolectaron 10 kg de frutos verdes de *Carica papaya* “papaya”.

3.2. Régimen de investigación

Libre, fue un proyecto autofinanciado

3.3. Procedimientos

3.3.1. Extracción y estabilización de la papaína

El látex fue recolectado de los frutos verdes, por incisión directa con un bisturí. El látex se recogió en tubos de ensayo estériles, conteniendo 5 mL de buffer fosfato 100 mM, pH 7,5. Después, los tubos fueron transportados en refrigeración a los laboratorios de Bioquímica y Farmacoquímica de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

El látex extraído, se deshidrató en un liofilizador (Marca Labotec modelo 0.1 JLG) a -

82 °C por 36 h. Del látex deshidratado se realizaron disoluciones al 0,1% (p/v) para el proceso de inmovilización.

3.3.2. Determinación de la actividad enzimática de la papaína libre

En un vaso de precipitado se tomaron 50 mL de solución de albúmina (1 mg/mL) preparado en buffer fosfato 100 mM, pH 7,5. Luego se añadieron 25 mg de látex liofilizado, y se incubó a temperatura ambiente (18 °C). Seguidamente, se tomaron 2 mL de muestra cada 30 min, se adicionó 0,5 mL del reactivo Folin Cicalteau y se dejó en reposar de 2 a 3 min; y luego se procedió a leer por espectrofotometría a 600 nm.

La medida de la actividad enzimática de la papaína se determinó por desaparición del sustrato (albúmina), utilizando el método de Lowry.

$$\text{Actividad de la papaína} = \text{Albúmina Inicial} - \text{Albumina final}$$

La actividad enzimática de la papaína se calculó teniendo los siguientes parámetros:

- Peso molecular de la albúmina : 66 382 Da (66 382 mol/g)
- Solución de albúmina 1mg/mL : 0,015 M (concentración inicial)
- 1 mg de albúmina : 0,015 moles de albúmina

La actividad enzimática (UI) se define como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol de sustrato en un minuto. Se expresa por mL de disolución (U/mL)

- $1 \text{ UI} = 1 \mu\text{mol se sustrato convertido} \times \text{min}^{-1}$
- $1 \text{ UI} = 16,67 \text{ nano Kat}$

La actividad específica es el número de unidades de enzima por miligramo de proteína (U/mg)

- $1 \text{ U} = 1 \mu\text{mol l} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$

3.3.3. Inmovilización de la papaína

3.3.3.1. Preparación del soporte y la columna. El soporte usado, fue el

exoesqueleto de *Bacillariophyceae sensu lato* (diatomea), alga unicelular, cuya composición es rica en silicio. De esta alga se recolectó aproximadamente 30 kg, de las minas abiertas ubicadas en la localidad de Vista Alegre, Distrito de Carmen Alto, Provincia de Huamanga, Departamento de Ayacucho a 2 768 m de altitud.

Se realizó una reducción de tamaño en un molino de cuchillas (marca Joval de 30 HP, con rotor de 480 x 300 mm), luego se procedió a seleccionar las partículas $\leq$ a 25 μm mediante un tamiz marca Haver & Boecker con aberturas de malla de 0,025 mm (25 μm).

Adicionalmente se usaron los soportes alúmina y sílica; de los soportes, se utilizaron empaquetados de 50 g en papel de acetato de celulosa, se prepararon nueve soportes para cada uno de los materiales utilizados en la inmovilización. Las columnas utilizadas fueron de vidrio “pirex”, de 30 cm de longitud, y 5 cm de diámetro interno, provista de una llave de teflón (Boeco Alemania).

3.3.3.2. Inmovilización de la papaína. La papaína se inmovilizó mediante adsorción en tres soportes: Alúmina (AL), Sílica (SI) y tierra de Diatomeas (DT).

Para cada uno de los soportes se siguió el siguiente procedimiento:

En un vaso de precipitado se colocaron 50 g de soporte, paralelamente se preparó una solución enzimática al 0,1% (p/v) del liofilizado de papaína en tampón fosfato 100 mM a pH 7,5 y se mezcló con el soporte e incubó a temperatura ambiente durante 60, 90 y 180 min.

En seguida se separó por centrifugación a 10 000 rpm durante 15 min, en una centrífuga Marca Amazon modelo ZG-5500. La porción sólida se empacó en una lámina de acetato de celulosa y se colocó dentro de la columna de retención. Posteriormente, se prepararon soportes sin papaína utilizando únicamente el tampón fosfato 100 mM a pH y temperatura de ensayo.

3.3.3.3. Porcentaje de papaína inmovilizada

Los filtrados y las soluciones residuales se recuperaron para la determinación del contenido de proteínas no absorbida mediante el método de Lowry (Lowry, 1951), utilizando como estándar albúmina sérica bovina. El mismo método se utilizó para la cuantificación de proteínas en la solución enzimática al 0,1%. La cantidad de enzima inmovilizada se obtuvo de la diferencia entre el contenido proteico de la solución enzimática y el detectado para los filtrados y las soluciones residuales.

El índice de inmovilización se calcula mediante la ecuación siguiente:

$$\% \text{ de Enzima inmovilizada} = \frac{\text{Enzima inmovilizada}}{\text{Enzima Total}} \times 100$$

3.3.3.4. Determinación de la actividad enzimática de la papaína inmovilizada

Para medir la actividad enzimática, primero se prepararon las soluciones de albúmina sérica bovina 1,0 mg/mL (0.015 M). Después, se añadieron 50 mL de esta solución a la papaína inmovilizada y se incubó a 25 °C, 30 °C, y 35 °C; a pH 7,0; 7,5 y 8,0. Pasados los 30 minutos, se recolectaron 2 mL de eluato para determinar la concentración de proteína mediante el reactivo de Folin-Cicalteau. Finalmente, se lavó la columna con tampón fosfato 100 mM a pH 7,0.

3.3.3.5. Determinación de proteínas por el método de Lowry

A cada tubo, conteniendo los eluatos del ensayo, se añadieron 2 mL del reactivo de Folin Cicalteau, luego se incubó 10 min a temperatura ambiente y se procedió según la tabla adjunta:

Reactivos	Blanco	Estándar	Eluato (muestra)
Agua destilada	2,0 mL	-	-
Albúmina 1mg/mL	-	2,0 mL	-
Muestra Eluato	-	-	2,0 mL
Reactivo de Folin Ciocalteau	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL

Los eluatos se leyeron a 600 nm en un espectrofotómetro marca Milton Roy, modelo Spectronic 20D+.

A partir de las absorbancias obtenidas en las lecturas, se utilizó la siguiente relación para determinar la actividad enzimática en UI.

$$UI = 1 \text{ } \mu\text{mol de sustrato hidrolizado } x \text{ min}$$

$$1 \text{ UI} = 16.67 \text{ nano Kat}$$

$$1 \text{ Kat} = 6 \times 10^7 \text{ nano U}$$

3.4. Análisis de datos

Los experimentos realizados, se trataron por triplicado. Las diferencias entre los promedios y las medias de las áreas de pico negativo fueron evaluadas mediante los análisis de varianza (ANOVA) , Test de Duncan y Tukey.

En este estudio, las diferencias se consideraron significativas con una $p < 0,05$.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Extracción y estabilización de la papaína

A partir del látex recolectado, en una solución buffer fosfato 100 mM, pH 7,5; se deshidrató, utilizando el Liofilizador marca Labotec, Modelo 0.1 JLG, a -82 °C por 36 h.

El rendimiento del liofilizado se calculó:

Peso del látex: 486,14 g;

Peso del liofilizado: 437,03 g;

Porcentaje de rendimiento = 89,9%

$$\% \text{ Rendimiento de extracción} = \frac{\text{Peso del latex liofilizado}}{\text{Peso del latex}} \times 100$$

$$\% \text{ Rendimiento de extracción} = \frac{437,03 \text{ g}}{486,14 \text{ g}} \times 100$$

$$\% \text{ Rendimiento de extracción} = 89,9$$

4.1.2. Determinación de la actividad enzimática de la papaína libre

De las lecturas realizadas se calculó la actividad enzimática de la papaína libre expresado en UI/mL, presente en el extracto.

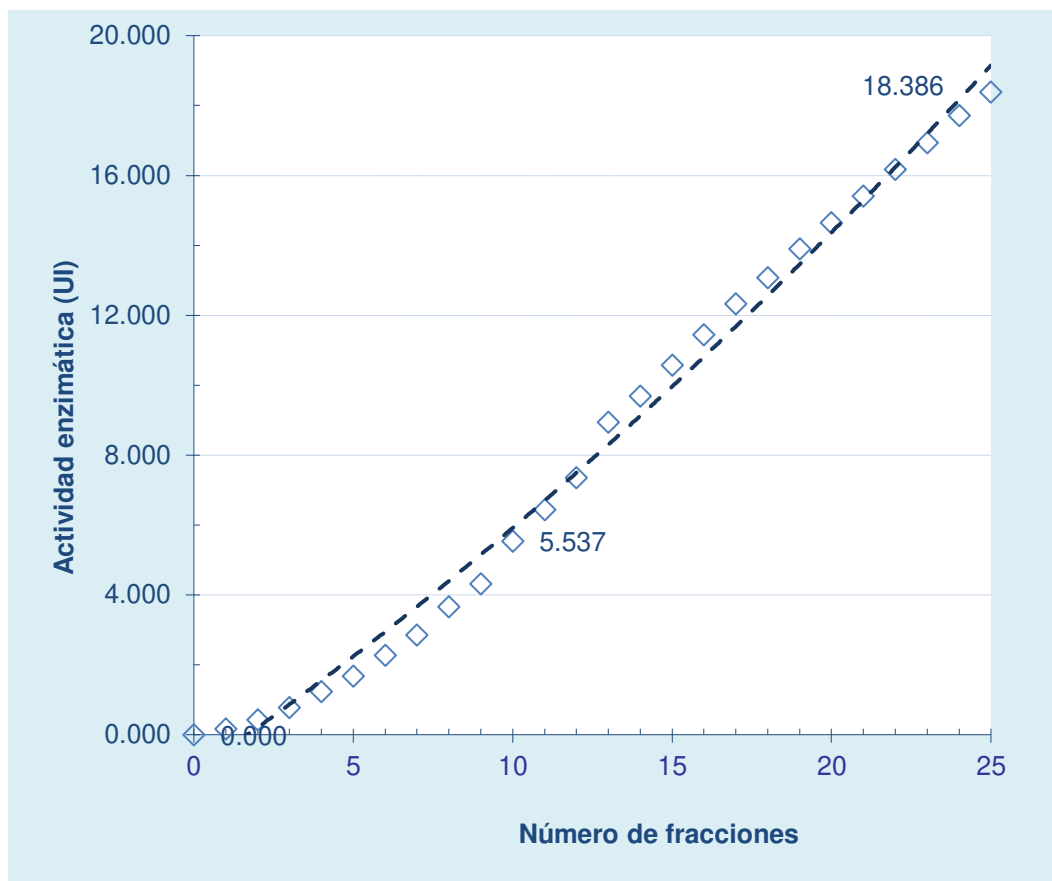


Figura 3. Actividad enzimática de la papaína libre de inmovilización. Trabajo de tesis.

En la figura 3 se observa la curva cinética enzimática de la papaína libre, el comportamiento de la curva es lineal y dependiente de la concentración de enzima. Entonces, si se incrementa la concentración de enzima, la velocidad de reacción aumenta de forma proporcional. En este contexto, el aumento en la velocidad de reacción, es proporcional directamente al incremento en la concentración de la enzima, siempre y cuando la concentración de sustrato no sea limitante. Así, en la figura 3, se puede notar que la actividad enzimática en la décima muestra es de 5,53 UI, y en la vigésima quinta de 18,38 UI. De esta forma, se evidencia un incremento de la actividad enzimática con respecto al tiempo.

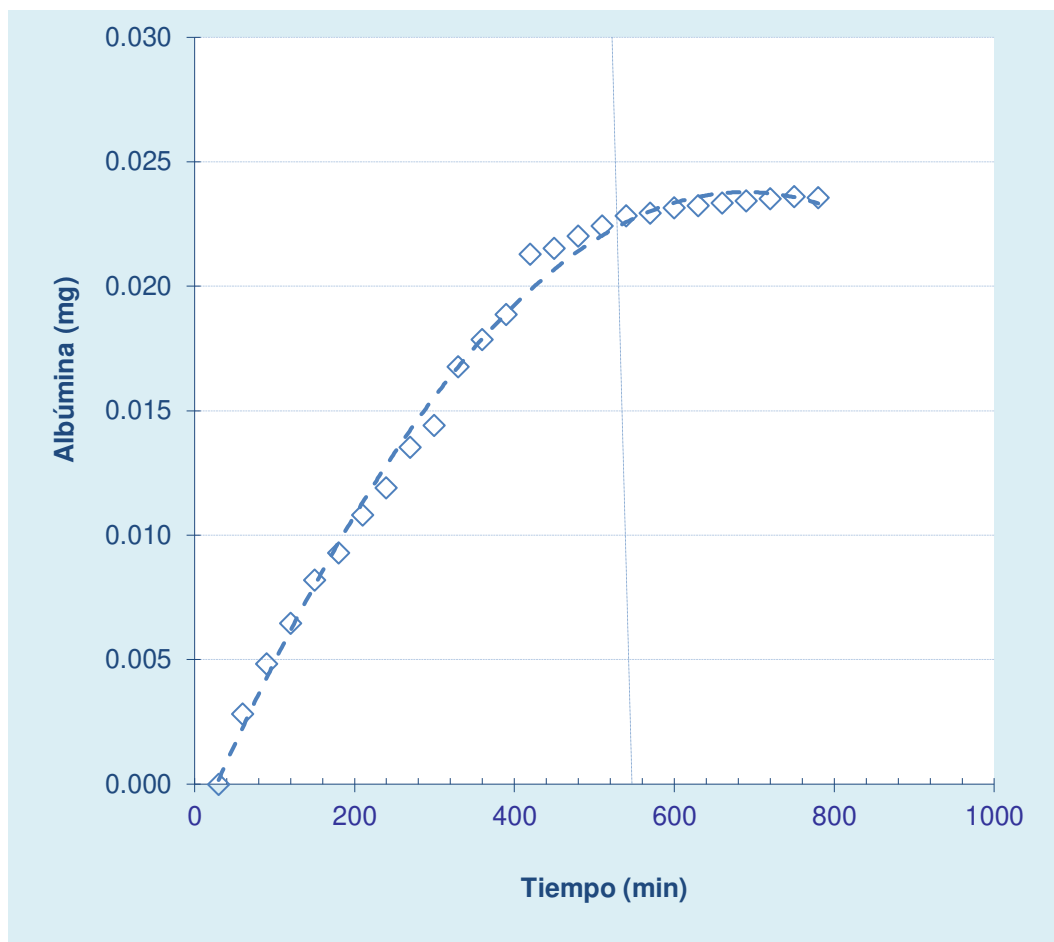


Figura 4. Comportamiento de la papaína en la hidrólisis de la albúmina sérica bovina según tiempo. Trabajo de tesis.

En la figura 4 se presenta el comportamiento de la papaína sin inmovilizar frente al sustrato, solución de albúmina 1 mg/mL, se observa que a medida que transcurre el tiempo, disminuye la formación de producto o la hidrólisis de la albúmina. La actividad enzimática se incrementa de forma lineal hasta los 300 min (5 h).

Considerando que la determinación de éste resultado se obtuvo después de la toma de 25 muestras, cada una de ellas con intervalos de 30 min. Al transcurrir 10 h, la velocidad de reacción permanece constante, esto puede ser debido a que el sustrato se agotó, o por inhibición de la enzima por el producto (aumento de la concentración de péptidos y aminoácidos).

En la figura 5 se presenta la gráfica de *Lineweaver-Burk* que indica que la actividad de la papaína tiene un comportamiento lineal.

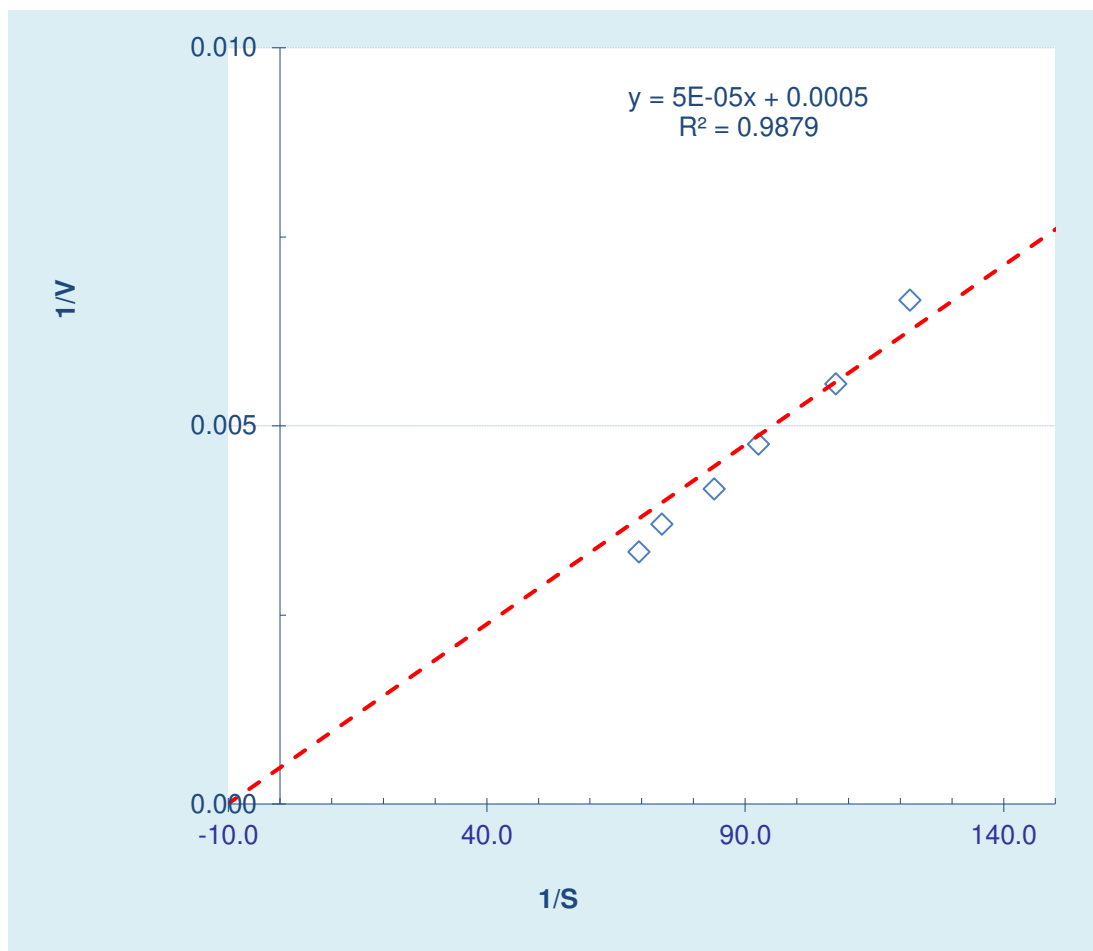


Figura 5. Gráfica de Lineweaver-Burk de la papaína. Trabajo de tesis.

En la figura 5 se presenta la gráfica de *Lineweaver-Burk* que permite determinar la velocidad máxima de reacción de la papaína 200 $\mu\text{mol}/\text{min}$, es decir, por cada minuto de reacción que transcurre, se hidrolizan 200 μmol de sustrato. De éste mismo grafico se calcula la K_m de 100 mg/L. De igual manera, la actividad específica de 50 UI/mg

4.1.3. Determinación del índice de inmovilización

La figura 6, muestra los porcentajes de inmovilización de la papaína en tres soportes y tres tiempos de contacto, la mayor inmovilización de ésta enzima se obtuvo a los 180 min en sílica, alcanzando un porcentaje de inmovilización de 97,26 %, seguido por el de tierra de diatomeas, con un 95,44 %.

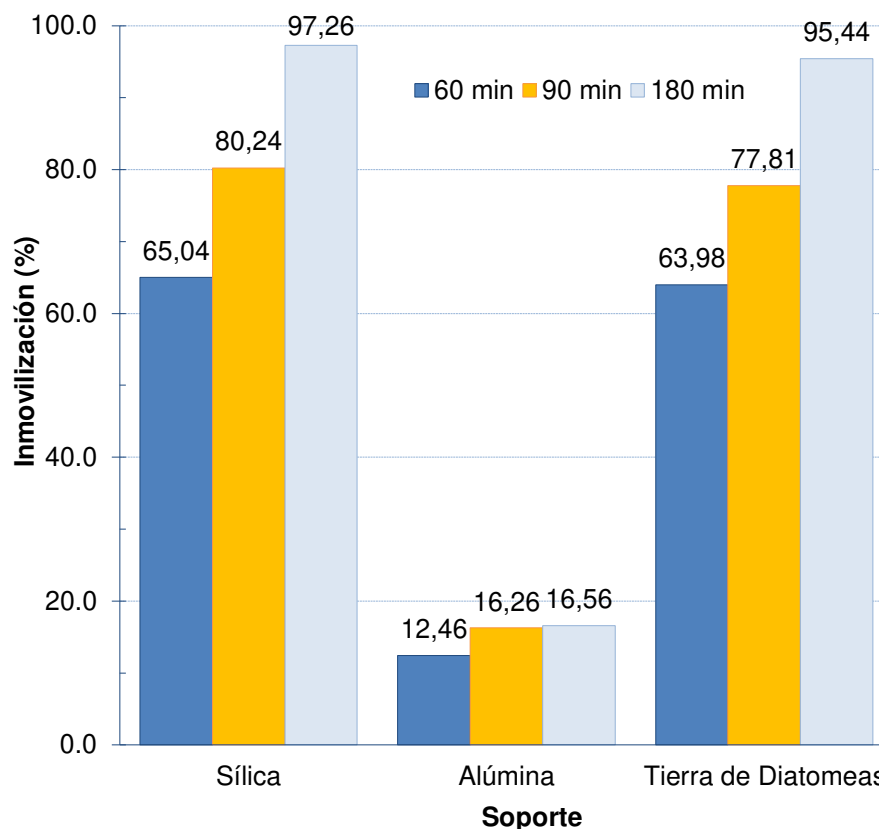


Figura 6. Porcentaje de inmovilización de la papaína vs. Tiempo. Trabajo de tesis.

4.1.4. Determinación de la actividad enzimática de la papaína inmovilizada

Para evaluar la capacidad de reutilización de la papaína se midió la actividad residual de la enzima después de haber sido utilizada hasta 10 veces. A continuación se presentan los cuadros de la actividad enzimática inicial y final obtenida de la albúmina tratada con la papaína inmovilizada.

La figura 7, muestra la actividad enzimática de la papaína inmovilizada en el soporte de sílica, a tres temperaturas de reacción. Se observa que la actividad enzimática a pH 7,0 y 30 °C es de 4,22 UI; mientras que a 35 °C es de 2,84 UI, de igual forma, a 25 °C la actividad enzimática es de 2,63 UI

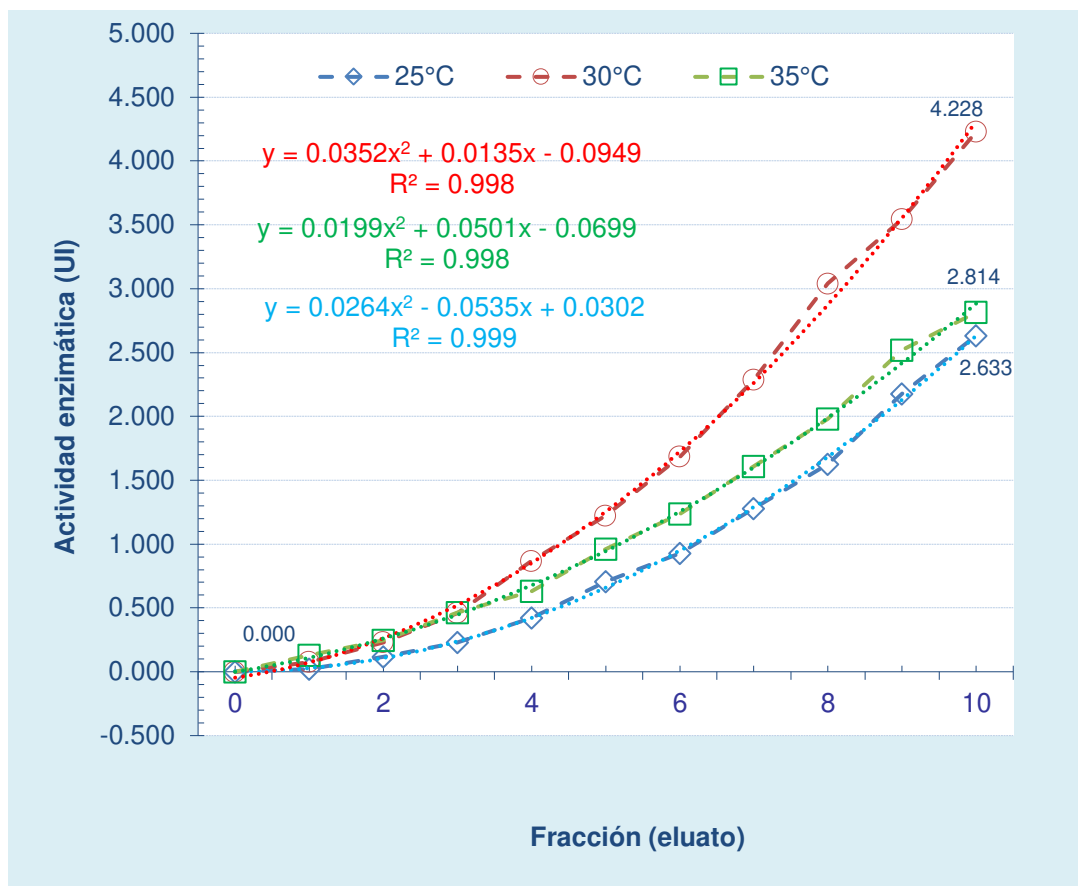


Figura 7. Actividad enzimática de la papaína inmovilizada en sílica a pH 7,0 según temperatura de reacción. Trabajo de tesis

La figura 7, muestra la actividad enzimática de la papaína inmovilizada en el soporte de sílica, y tratadas con tres temperaturas. Se observa que la actividad enzimática a pH 7,0 y 30 °C es de 4,228 UI ; mientras que a 35 °C es de 2,814 UI , de la misma manera, a 25 °C la actividad enzimática es de 2,633 UI.

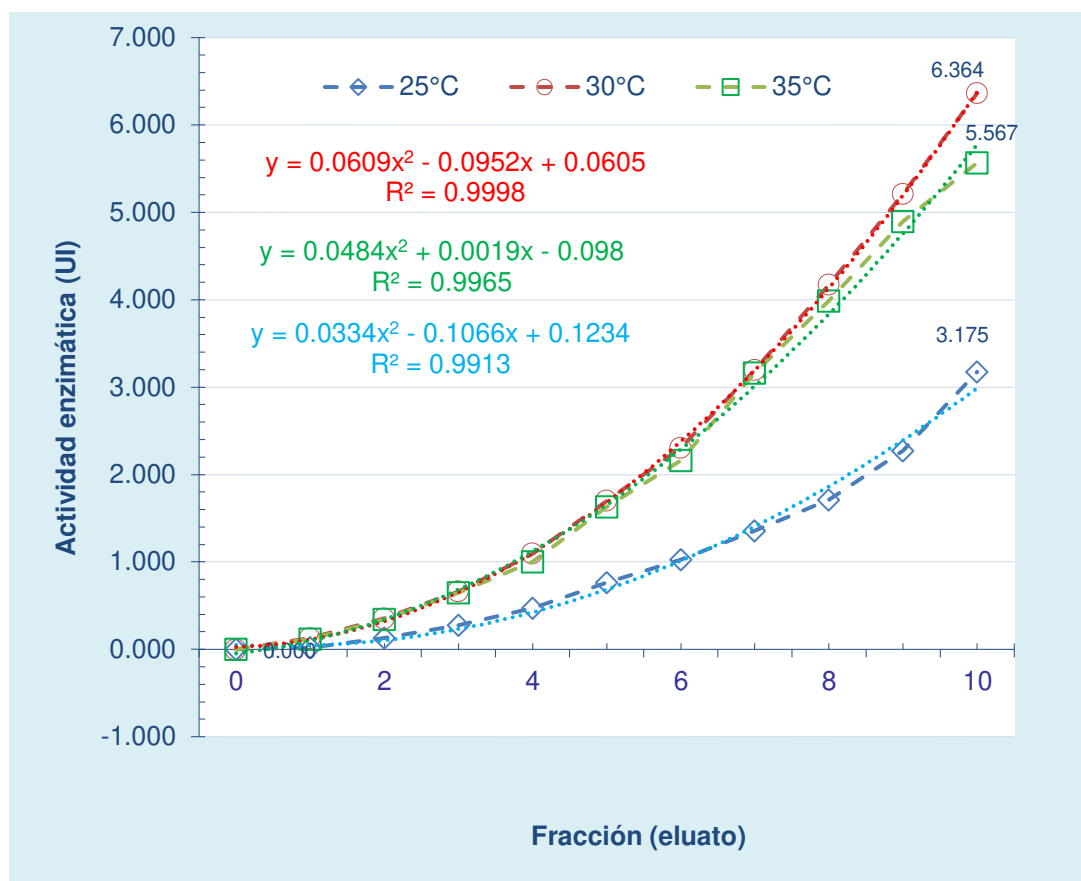


Figura 8. Actividad enzimática de la papaína inmovilizada en sílica a pH 7,5 según temperatura de reacción. Trabajo de tesis .

La figura 8, muestra la actividad enzimática de la papaína inmovilizada en el soporte de sílica, a tres temperaturas de reacción. Se observa que la actividad enzimática a pH 7,5 y 30 °C es de 6,36 UI, mientras que a 35 °C es de 5,56 UI, de la misma manera, a 25 °C la actividad enzimática es de 3,17 UI

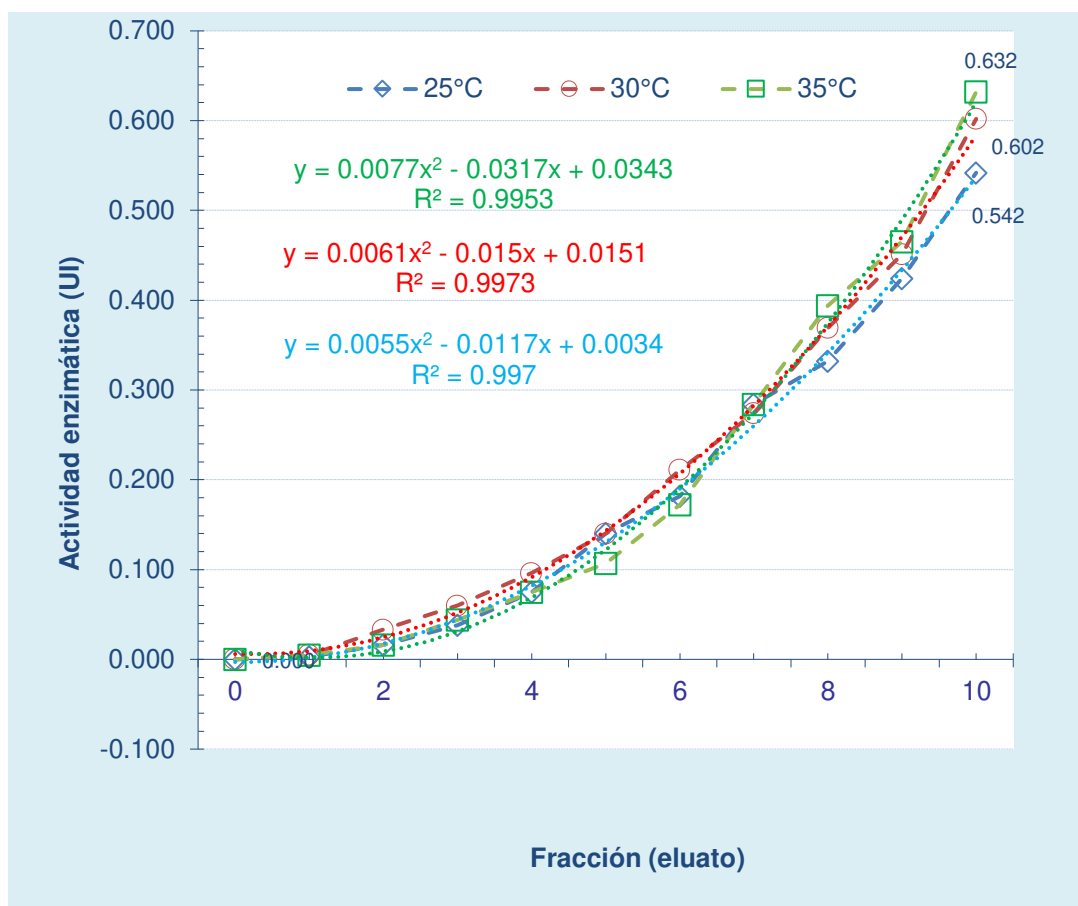


Figura 9. Actividad enzimática de la papaína inmovilizada en sílica a pH 8,0 según temperatura de reacción. Trabajo de tesis.

La figura 9, muestra la actividad enzimática de la papaína inmovilizada en el soporte de sílica, a tres temperaturas de reacción. Se observa que la actividad enzimática a pH 8,0 y 35 °C es de 0,63 UI, mientras que a 30 °C es de 0,60 UI, de la misma manera, a 25 °C la actividad enzimática es de 0,54 UI.

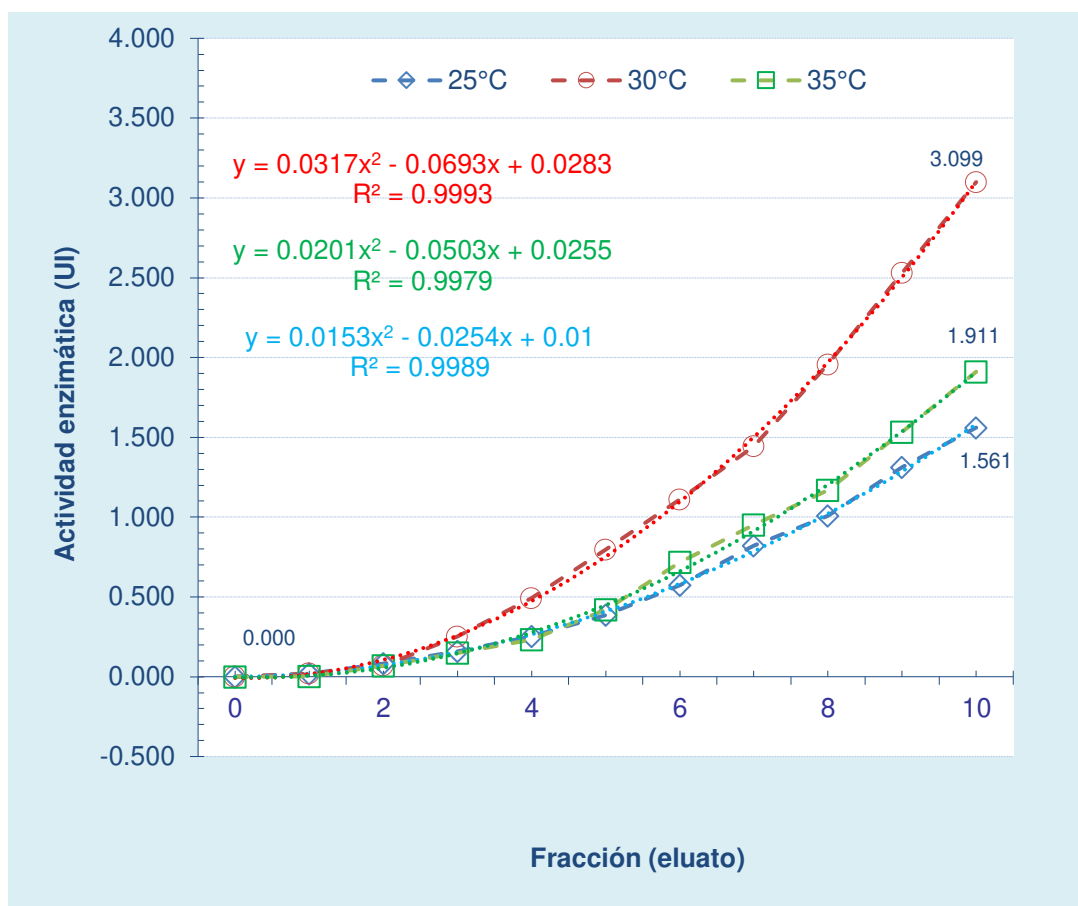


Figura 10. Actividad enzimática de la papaína inmovilizada en alúmina a pH 7,0 según temperatura de reacción. Trabajo de tesis.

La figura 10, muestra la actividad enzimática de la papaína inmovilizada en el soporte de alúmina, a tres temperaturas de reacción. Se observa que la actividad enzimática a pH 7,0 y 30 °C es de 3,09 UI, mientras que a 35 °C es de 1,91 UI, de la misma manera, a 25 °C la actividad enzimática es de 1,56 UI.

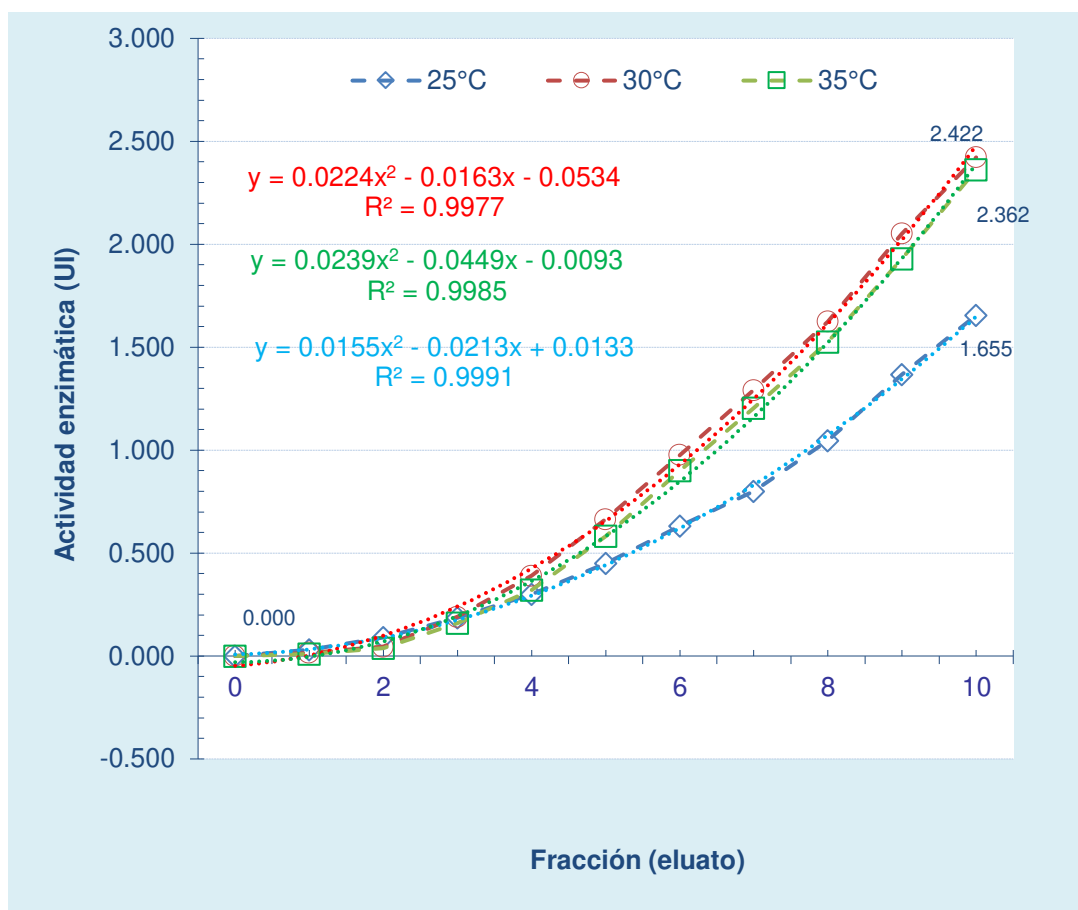


Figura 11. Actividad enzimática de la papaína inmovilizada en alúmina a pH 7,5 según temperatura de reacción. Trabajo de tesis.

La figura 11, muestra la actividad enzimática de la papaína inmovilizada en el soporte de alúmina, a tres temperaturas de reacción. Se observa que la actividad enzimática a pH 7,5 y 30 °C es de 2,42 UI, mientras que a 35 °C es de 2,36 UI, de la misma manera, a 25 °C la actividad enzimática es de 1,65 UI.

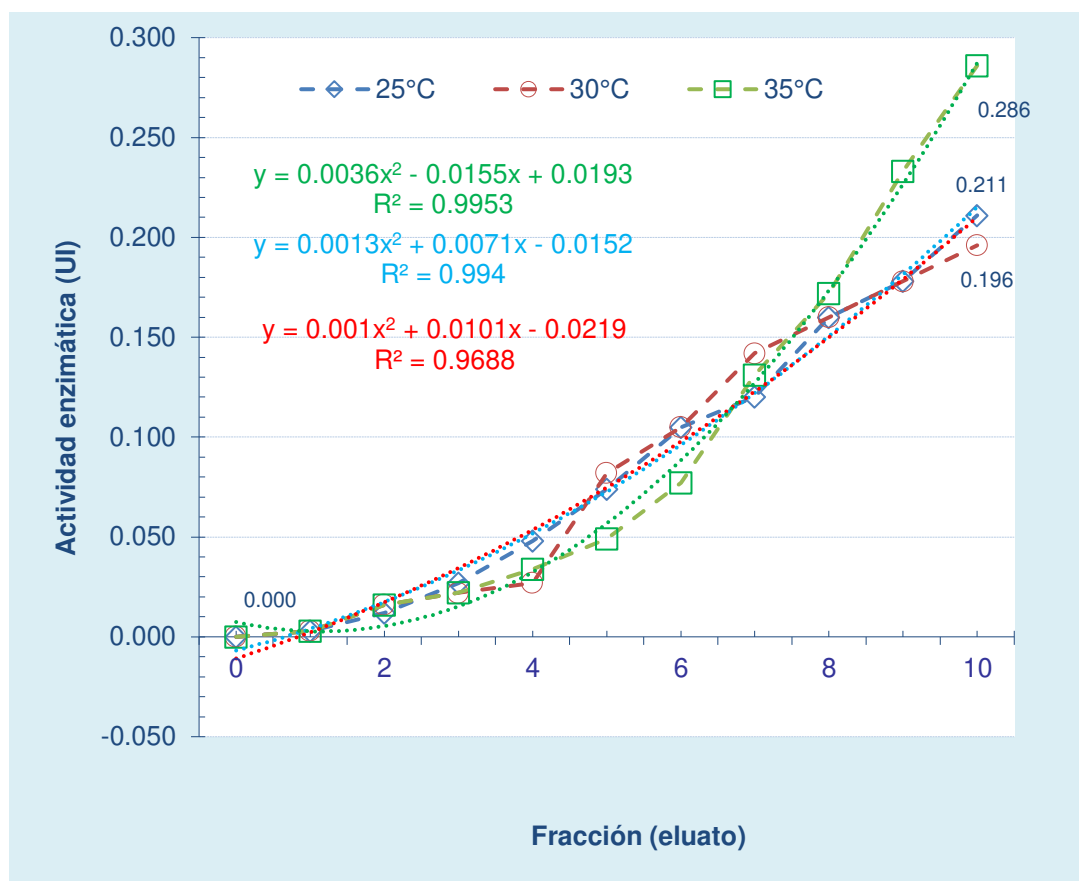


Figura 12. Actividad enzimática de la papaína inmovilizada en alúmina a pH 8,0 según temperatura de reacción. Trabajo de tesis.

La figura 12, muestra la actividad enzimática de la papaína inmovilizada en el soporte de alúmina, a tres temperaturas de reacción. Se observa que la actividad enzimática a pH 8,0 y 35 °C es de 0,28 UI, mientras que a 25 °C es de 0,211 UI, de la misma manera, a 30 °C la actividad enzimática es de 0,19 UI.

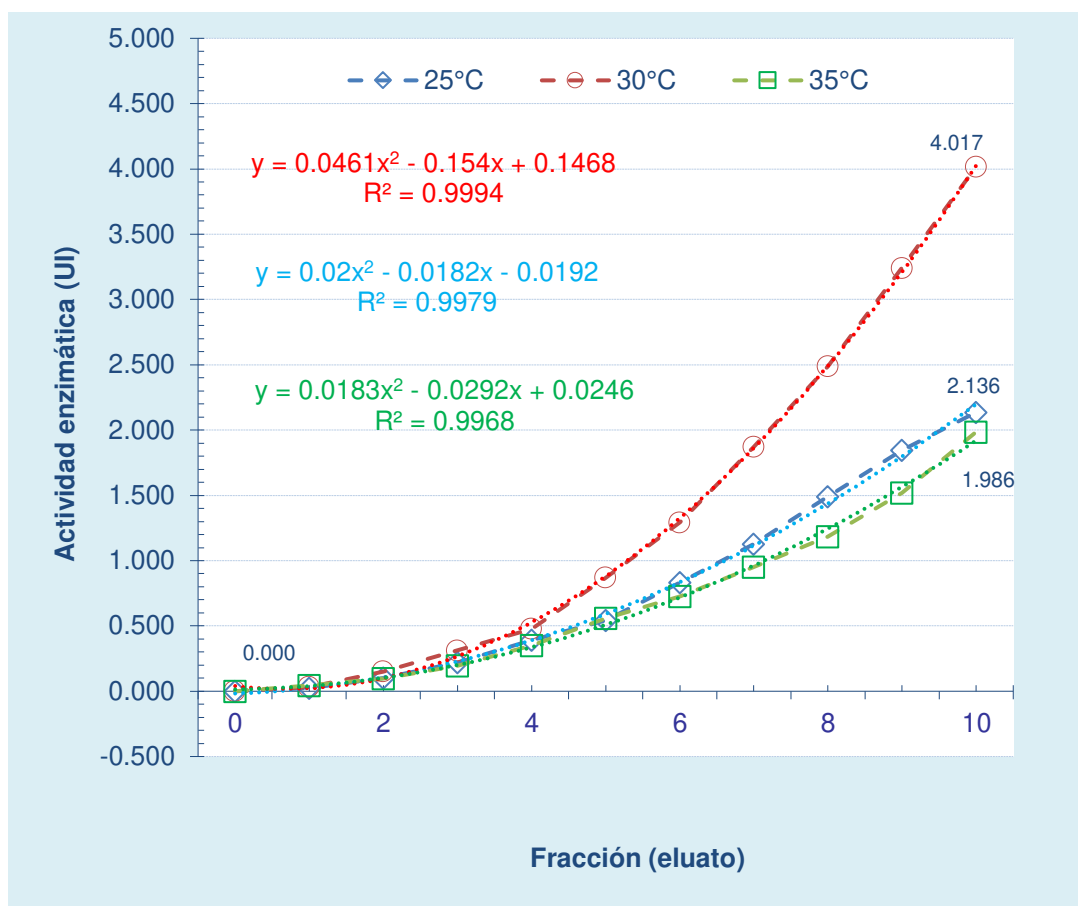


Figura 13. Actividad enzimática de la papaína inmovilizada en tierra de diatomeas a pH 7,0 según temperatura de reacción. Trabajo de tesis

La figura 13, muestra la actividad enzimática de la papaína inmovilizada en el soporte de diatomea, a tres temperaturas de reacción. Se observa que la actividad enzimática a pH 7,0 y 30 °C es de 4,01 UI, mientras que a 25 °C es de 2,13 UI, de la misma manera, a 35 °C la actividad enzimática es de 1,98 UI.

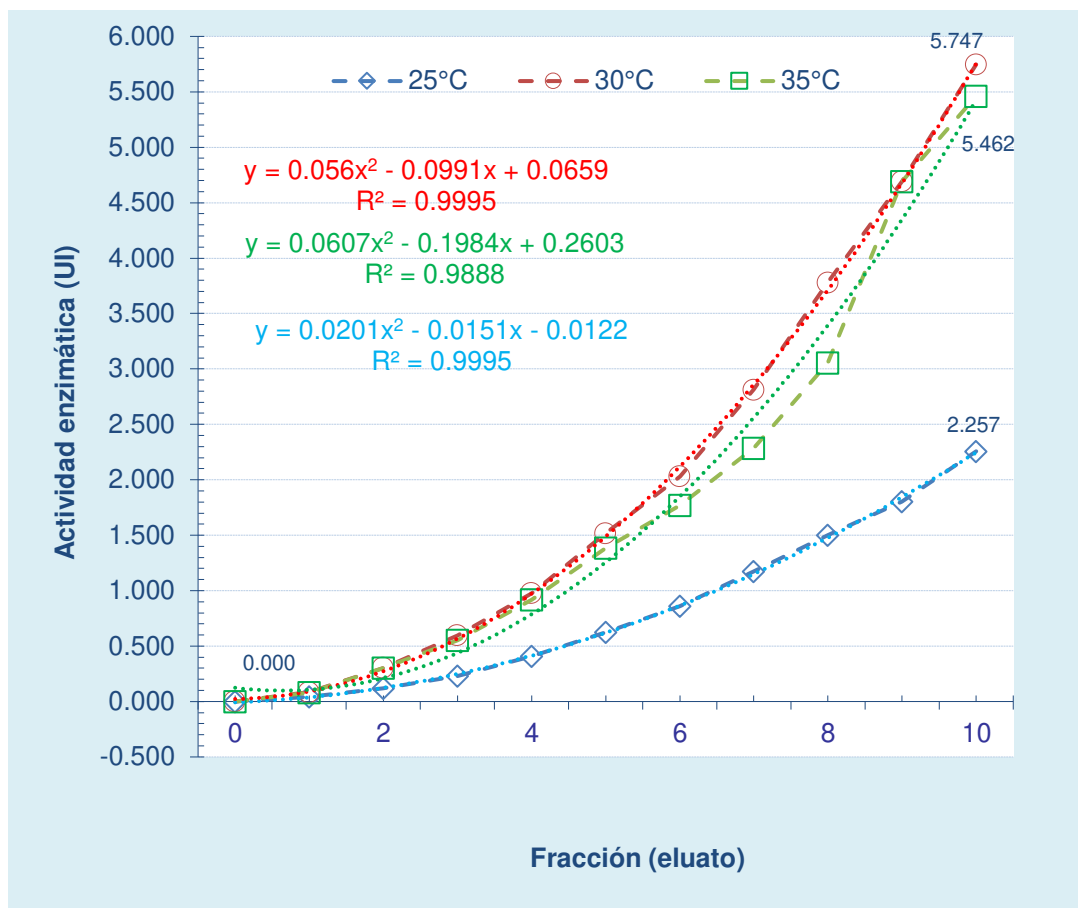


Figura 14. Actividad enzimática de la papaína inmovilizada en tierra de diatomeas a pH 7,5 según temperatura de reacción. Trabajo de tesis.

La figura 14, muestra la actividad enzimática de la papaína inmovilizada en el soporte de diatomeas, a tres temperaturas de reacción. Se observa que la actividad enzimática a pH 7,5 y 30 °C es de 5,74 UI, mientras que a 35 °C es de 5,46 UI, de la misma manera, a 25 °C la actividad enzimática es de 2,25 UI.

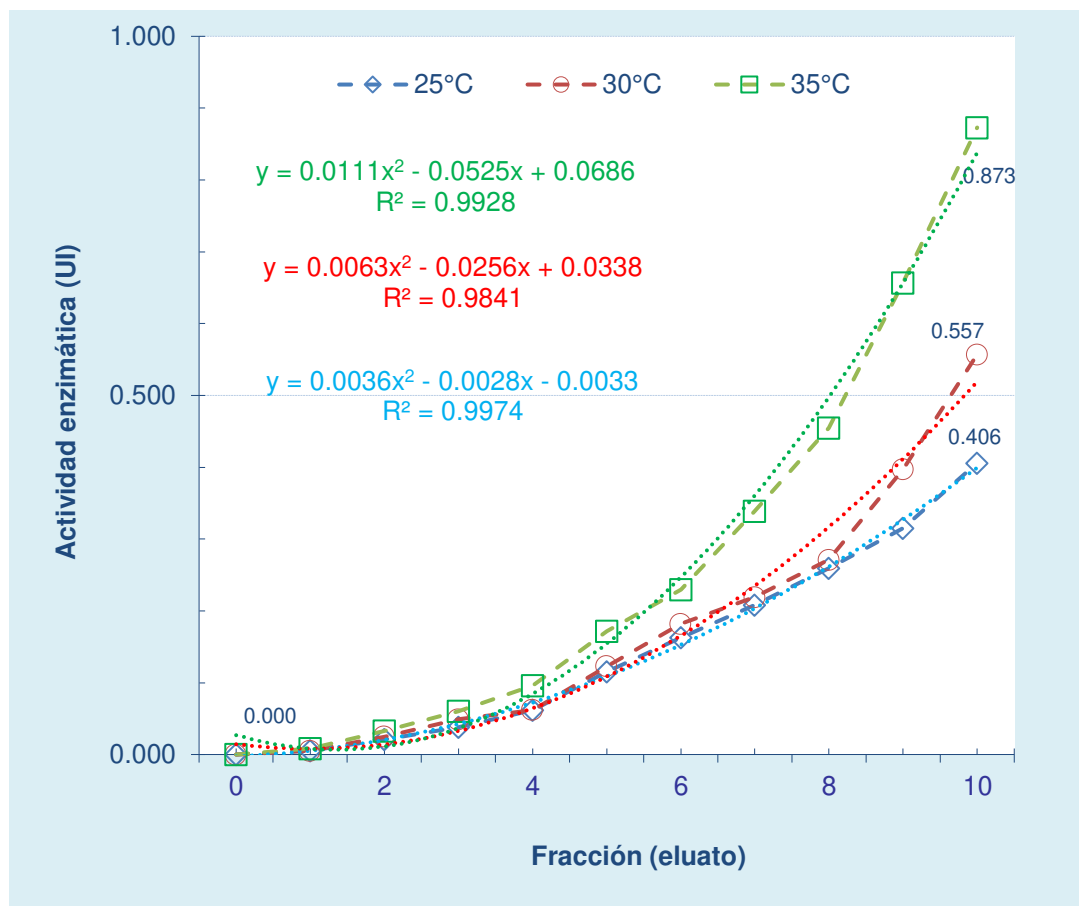


Figura 15. Actividad enzimática de la papaína inmovilizada en tierra de diatomeas a pH 8,0 según temperatura de reacción. Trabajo de tesis

La figura 15, muestra la actividad enzimática de la papaína inmovilizada en el soporte de diatomea, a tres temperaturas de reacción. Se observa que la actividad enzimática a pH 8,0 y 35 °C es de 0,87 UI, mientras que a 30 °C es de 0,55 UI, de la misma manera, a 25 °C la actividad enzimática es de 0,406 UI

4.2. Discusión

La papaína, cisteín proteasa obtenida principalmente del látex de *Carica papaya*, es ampliamente utilizada en las industrias: alimentaria, farmacéutica, médica, textil, entre otras. Esta enzima es obtenida de fuentes vegetales, su producción depende de factores climáticos no controlados; por ello, es necesario diseñar estrategias para optimizar su uso a nivel industrial de tal forma que sea un insumo orgánico sostenible. En este contexto, la tecnología de inmovilización es una alternativa para la reutilización de la

papaína, lo cual disminuye los costos del bioproceso. En este contexto, se inmovilizó la papaína sobre tierra de diatomeas, un soporte poroso subvalorado y abundante del distrito El Carmen Alto, de la Provincia de Huamanga - Ayacucho.

En la primera parte de la investigación, la actividad de la papaína soluble presente en el látex de la papaya fue determinada a pH 7,0 y temperatura ambiente (figura 4), la cual se incrementa hasta los 300 min. En la figura 5 se presenta la curva de actividad de la papaína soluble, la velocidad de reacción fue 200 $\mu\text{mol}/\text{min}$, ésta aumenta hasta llegar a ser constante, con variaciones mínimas. Al respecto, Segel (1999) señala que este fenómeno se produce cuando los sitios activos de la enzima están saturados por el sustrato o por inhibición de productos. Asimismo, la papaína presentó una actividad específica de 50 UI/mg de proteínas presentes en el látex.

Con respecto a la inmovilización de enzimas sobre soportes sólidos se puede lograr utilizando una amplia variedad de compuestos químicos orgánicos e inorgánicos; y métodos físicos (Cao 2005; DiCosino y col 2013; Sheldon y Van Pelt 2013). La adsorción hace uso de las interacciones físicas generadas entre el soporte y la enzima que incluye fuerzas de van der Waals, interacciones iónicas y enlaces de hidrógeno. En particular, cualquier soporte puede ser aplicado para la adsorción de enzimas, pero no todas las enzimas pueden ser inmovilizadas en todos los soportes.

Hanefeld y col, (2013) por su parte indican que el atrapamiento, es sencillo desde el punto de vista experimental, usa poca enzima para obtener derivados activos. Sin embargo, el proceso requiere un control riguroso de las condiciones de unión para evitar la inactividad de los residuos catalíticos responsables de la conversión del sustrato en producto.

En este trabajo, se utilizaron los soportes inorgánicos: alúmina, sílica y tierra de diatomeas, los índices de inmovilización se incrementaron con el mayor tiempo de contacto. Así, a temperatura ambiente y 180 min se produce una mejor inmovilización con 96,26 % en sílica, 95,44 % en tierra de diatomeas y 16,56 % en alúmina. En este aspecto, Afaq y Iqbal (2001) inmovilizaron papaína en sefarosa activada con Cu^{+2} hallaron 96% a temperatura ambiente y 3 h. Asimismo, Biasutti y col, (2006)

utilizando carbón activado y alúmina encontraron 97,4% y 13,2% respectivamente a 25 °C y 30 min. Estas diferencias se pueden explicar por la presencia de grupos activos específicos en el soporte, que permiten la interacción entre enzima-soporte. Sin embargo, se pueden mejorar las interacciones aplicando agentes intermedios o modificadores de soportes.

Con referencia a las actividades de la papaína inmovilizada sobre sílica a pH 7,0; 7,5 y 8,0 y a temperaturas de 25 °C, 30 °C y 35 °C (figuras 7-9). La mayor actividad enzimática se produce a pH 7,5 y 30 °C, con 6,36 UI (figura 8), seguido de la actividad de 5,56 UI a pH 7,5 a 35 °C. En este caso, la inmovilización podría conllevar a una rigidez conformacional de la estructura de la proteína causando sensibilidad a pequeños cambios tanto de pH como de temperatura, entre otros Zhu y col, (2007); Magner (2013).

Con relación a las actividades de la papaína inmovilizada sobre alumina a pH 7,0; 7,5 y 8,0 y a temperaturas de 25 °C, 30 °C y 35 °C (figuras 10 -12). Estas son 3,09 UI, a pH de 7,0 y 30 °C, seguido de 2,42 UI a pH de 7,5 y 30 °C. En este aspecto, Biasutti y col, (2006) utilizaron alúmina y carbón activado para la inmovilización de papaína, el mayor atrapamiento fue en carbón activado; sin embargo, la alúmina presentó mayor estabilidad en las condiciones de reacción utilizadas.

En las figuras de la 13 a 15 se presentan las actividades enzimáticas de la papaína inmovilizada en tierra de diatomeas, a distintos pH y temperaturas. La mayor actividad enzimática fue 5,74 UI a pH 7,5 y 30 °C, este valor fue cercano al obtenido en sílica en las mismas condiciones de reacción. Al respecto, Kaufhold y col (2008) señalan que la tierra de diatomeas presenta compuestos como contenido cristalino de silicio alrededor de un 87-94% de dióxido de silicio (SiO_2) con cantidades significativas de alúmina (Al_2O_3) y óxido férrico (Fe_2O_3). Así, contrastando los resultados de la inmovilización y la actividad enzimática (figuras 6 y 8), se observa que el mejor soporte es sílica, seguido por tierra de diatomeas por contener un alto porcentaje de dióxido de silicio (sílica) Reshmi y col (2006).

4.2.1. Análisis de Datos

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Las diferencias entre las medias se evaluaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) y el análisis de Duncan. En este estudio, las diferencias se consideraron significativas con $p < 0,05$.

Tabla 3. Análisis de varianza de la inmovilización enzimática
ANOVA

VAR00001

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	8420,501	2	4210,250	24,589	,001
Intra-grupos	1027,335	6	171,223		
Total	9447,836	8			

El análisis estadístico de varianza practicado sobre los valores de inmovilización enzimática expresado en porcentaje e índice, determina que si existe diferencia significativa entre los grupos de trabajo, es decir que los valores expresados en porcentaje e índice, varían cuando se ensaya sobre un soporte y en un tiempo determinado.

Tabla 4. Significancia estadística de la inmovilización enzimática: Prueba de Duncan

VAR00001

Duncan^a

VAR00004	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
2,00	3	15,0933	
3,00	3		79,0767
1,00	3		80,8467
Sig.		1,000	,874

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica
= 3,000.

1, Sílica; 2, alúmina; 3, tierra de diatomeas

Para corroborar lo descrito en el análisis de varianza, se utilizó el test de Duncan, con un nivel de confianza del 95 %, el cual presenta el análisis estadístico en comparación de medias de los tres soportes utilizados en la inmovilización enzimática. La mayor significancia se presenta entre los valores expresados en porcentaje de inmovilización, utilizando los tres soportes a 180 min. De la misma manera, se indica que la mayor diferencia significativa existe entre el soporte de sílica y el de alúmina, a 180 min de contacto, lo mismo ocurre entre el soporte de alúmina y el soporte de tierra de diatomeas. Pero también, estos datos indican que entre los soportes de sílica y tierra de diatomeas, no existe significancia estadística.

Tabla 5. Significancia estadística de la inmovilización enzimática: Prueba de Tukey

Comparaciones múltiples

VAR00001

HSD de Tukey

(I) VAR00004	(J) VAR00004	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1,00	2,00	65,75333*	10,68402	,002	32,9718	98,5349
	— 3,00	1,77000	10,68402	,985	-31,0115	34,5515
2,00	1,00	-65,75333*	10,68402	,002	-98,5349	-32,9718
	— 3,00	-63,98333*	10,68402	,002	-96,7649	-31,2018
3,00	1,00	-1,77000	10,68402	,985	-34,5515	31,0115
	— 2,00	63,98333*	10,68402	,002	31,2018	96,7649

*, La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

VAR00001

HSD de Tukey^a

VAR00004	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
2,00	3	15,0933	
3,00	3		79,0767
1,00	3		80,8467
Sig.		1,000	,985

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

El análisis estadístico con el test de Tukey, con un nivel de confianza del 95 %, afirma y fortalece la prueba realizada con el de Duncan, indicando que la significancia estadística se encuentra entre el soporte de sílica versus el de alúmina y, de la misma manera, entre soportes de alúmina y el de tierra de diatomeas, siendo menor entre sílica y tierra de diatomea.

En alumina, el porcentaje de enzima inmovilizada fue de 16,56 % a los 180 min, este valor fue menor a los obtenidos en sílica y tierra de diatomea.

El análisis de varianza reporta que si hay diferencia significativa entre los grupos de trabajo, es decir que los valores expresados en porcentaje e índice, varían estadísticamente cuando se ensaya sobre un soporte y en un tiempo determinado.

El procedimiento del análisis de Duncan, indica que la mayor diferencia significativa existe entre sílica y alúmina, a un tiempo de 180 min de contacto, lo mismo ocurre entre los soportes de alúmina y tierra de diatomeas.

Además, los datos indican que entre los soportes de sílica y tierra de diatomeas, no existe significancia estadística.

Tabla 6. Significancia estadística de la actividad enzimática: Prueba de Tukey

Comparaciones múltiples

VAR00001

HSD de Tukey

(I) VAR00004	(J) VAR00004	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1,00	2,00	65,66755 [*]	8,63266	,002	32,7435	99.1498
	— 3,00	1,42300	8,63266	,991	-31,5010	-34,3560
2,00	1,00	-65,66755 [*]	8,63266	,002	-99,1498	-32,7435
	— 3,00	-64,24455 [*]	8,63266	,002	-97.7268	-31,3195
3,00	1,00	-1,42300	8,63266	,991	-34,3560	31,5010
	— 2,00	64.24455 [*]	8,63266	,002	31,3195	97,7268

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

El análisis estadístico con el test de Tukey, con un nivel de confianza del 95%, en el tratamiento estadístico para determinar la significancia de la actividad enzimática, indica que existe significancia en los resultados obtenidos en los tres soportes entre sílica y alúmina; y alúmina y tierra de diatomeas.

CAPITULO 5: IMPACTOS

- a) La tierra de diatomeas es un soporte alternativo para la inmovilización de enzimas, ya que se obtuvieron porcentajes de inmovilización de 63,98 %; 77,81 % y 95,4 % en tiempos de 60, 90 y 180 min respectivamente, lo cual favorece una aplicación de este material orgánico subvalorado, existente en la provincia de Huamanga - Ayacucho.

Al respecto, existe una patente de invención sobre la preparación de quimiotripsina inmovilizada en tierra de diatomeas, inscrita en el registro de propiedad industrial de España.

- b) Se logró una actividad enzimática de 5,74 UI de la papaína inmovilizada a 30 °C, lo cual permite reafirmar que el soporte de tierra de diatomeas es adecuado para la inmovilización de la papaína, sin reducir su actividad enzimática.
- c) Considerando que la tierra de diatomeas es un soporte barato, cuya composición química cuantitativa aproximada es: $\text{SiO}_2 = 86,30\%$, $\text{Al}_2\text{O}_3 = 4,50\%$, $\text{Fe}_2\text{O}_3 = 1,57\%$; y $\text{CaO} = 1,43\%$, composición porcentual de SiO_2 es cercana al soporte sílica, siendo los porcentajes de inmovilización de papaína de 97,26% para sílica y 95,44% para tierra de diatomeas.
- d) El dióxido de silicio como la tierra de diatomeas pueden ser considerados como soportes altamente absorbentes, es así que la sílica se cataloga como el soporte de mayor capacidad de absorción que se conoce actualmente, de la misma manera, no son tóxicos, incoloros, insoluble en agua, químicamente estable, solo reacciona con el ácido fluorhídrico y los álcalis.
- e) Respecto al rendimiento de inmovilización, se encontró que el porcentaje promedio fue 71,8 % en la utilización de la enzima a pH 7,5 y 30 °C, esto para el soporte de tierra de diatomeas, pues con el soporte de sílica se obtuvo un 68,3 % de rendimiento, realizando la experimentación a 30 °C, pH 7,5 y tiempo de contacto de 180 min.

CONCLUSIONES

- 1.- La papaína obtenida del látex de *Carica papaya* (papaya) presento una velocidad de reacción de 200 $\mu\text{mol}/\text{min}$, K_m 100 mg/L μmol , y actividad específica de 50 UI/mg.
2. La inmovilización de papaína en tierra de diatomeas y sílica fue 95,44% y 97,26% respectivamente.
3. Las actividades enzimáticas de la papaína inmovilizada fueron en sílica 6,36 UI; alúmina 3,09 UI y tierra de diatomeas 5,74 UI a pH 7,5 y 30°C.

RECOMENDACIONES

La tierra de diatomeas es un soporte muy adsorbente, se recomienda realizar estudios de su uso a escala semi e industrial. Asimismo, se debería optimizar las condiciones operativas para el proceso de inmovilización, y determinar el tiempo y la temperatura de almacenamiento o conservación de la enzima inmovilizada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.-Arroyo, M. (2010). *Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications*. Madrid: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Complutense de Madrid
- 2.-Biasutti, E., De Marco, L.M., Afonso, W.O., Silva, V.D.M., Lopes, D.C.F., Silvestre, M.P.C. (2006). Utilización de dos soportes para la inmovilización de la papaína. *Ars Pharmaceutica*, 47(4), 425- 435.
- 3.-Billigmann, V. P. (1995). Enzyme therapy - an alternative in treatment of herpes zoster. A controlled study of 192 patients. *Fortschr Med.*, 113 – 43.
- 4.-Bu'lock, J., Kristianse, B. (1991). *Biotecnología Básica*. España: Editorial Acribia.
- 5.-Burdick E. Carpaine. An alkaloid of *Carica papaya*. (1971). *Chemistry and pharmacology. Economic Botany*; 25(4):363-365.
- 6.-Cao, L (2005). Immobilized enzymes: science or art. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9,217-226
- 7.-Carretero E. (2000); *Panorama Actual Med*, 24 (231), 223-226
- 8.-Casablanco, F., López, S. (1998). *Ingeniería Bioquímica*. España: Editorial Síntesis.
- 9.-Clapés, P., Valencia, G., Haro, I., García, J. M., Reig, F. y Mata, J. (1989). *Procedimiento de preparación de α -quimotripsina inmovilizada sobre tierra de diatomeas*. España: Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Patente de Invención.
- 10.-Cortes, AM., Mora, R. E., y Vargas, J C. (2008). *Inmovilización de lipasas: estudio de la actividad catalítica en la esterificación de ácidos grasos*. Bogotá: Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia.
- 11.-Crueger, W., Crueger, A. (1993). *Biotecnología: Manual de microbiología industrial*. España: Editorial Acribia.
- 12.-DiCosimo, R., McAuliffe, J., Polouse, A.J, Bohlmann, G. (2013). Industrial use of immobilized enzymes. *Chem. Soc. Rev.* 42, 6437-6474
- 13.- Federico, O; Flores, M; Paz,A; Farías, M. (2009). Extremophile culture collection from Andean lakes. Extreme printine enviroments that host a wide diversity of microorganisms with tolerance to uv radiation. *Springer; Microbial Ecology*;58;3; 6.2009, 461-473
- 14.-Fernández, J. (2005). *Plan de negocio para la producción de papaína en la séptima región*. (Tesis de pregrado). Universidad de Talca, Chile.
- 15.-Gacesa, P., Hubble, J. (1990). *Tecnología de las enzimas*. España: Editorial Acribia.
- 16.- Grudkowska, M. y Zagdańska, B. (2004). Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochim. Pol.*, 51(3), 609–24
- 17.-Gustavo, S., Garro, A., Oscar A., y Judis, M. A. (2008). *Hidrólisis de proteínas de soya con cascara de Carica papaya*. Argentina: Facultad de Agroindustrias -

UNNE

- 18.-Hanefeld, U., Cao L., Magner E. (2013) Enzyme immobilization: Fundamentals and application. *Chem., Soc. Rev.* 42,6211-6212
- 19.-Howat, R. C., Lewis G. D. (1972). The effect of bromelain therapy on episiotomy wounds a double-blind controlled clinical trial. *J Obstet Gynaecol Br Commonw.*, 79(1), 951 - 9534.
- 20.-Jagnow, G., Dawid, W. (1991). *Biotecnología: Introducción a los experimentos modelo*. España: Editorial Acribia.
- 21.- Afaq S & Iqbal J. (2002). *Immobilization and stabilization of papaína in quelata sefarosa that: a regenerable carrying metal of the chelate*. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, 4(3), 1-5
- 22.-Kaufhold, S.,Dohrmann, R., C. Urlichs, C. (2008). Shelf life stability of diatomites. *Appl. Clay Sci.*, 41 (3-4), 158-164
- 23.-Lopez, I., Diaz, V., y Merino, C. (1996) La bromelina, una proteasa de interés industrial. *Ciencia y tecnología alimentaria*, 2(1), 18-22.
- 24.-Lowry, O. H., Rosebrough, N .J., Farr, A. L. y Randall. R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- 25.-Magner, E. (2013). Immobilization of enzymes on merosporus silicate materials. *Chem. Soc. Rev.* 42, 6213-6222
- 26.- Martínez Freyre, Pascual (1996). *La nueva filosofía de la mente*. Edit. Gedisa, Barcelona
- 27.-Martínez H., Rojo D., y Padilla Z. (2002). *Estudio del prosegmento de papaína para identificar los elementos estructurales que le confieren función como chaperón intermolecular*. México: Departamento de Química. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Área de Biofísicoquímica, Departamento de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma Metropolitana,Cuajimalpa
- 28.- Medeiros V. D., De Marco L., Wendel A., Lopes C.F., y Coelho M. (2008). Comparative Study of the Immobilization of Pancreatin and Papain on Activated Carbon and Alumina, Using Whey as Protein Substrate. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science*. 44(1).
- 29.-Mihaesco C., y Máximo S. (2006). Fragments the Digestion of the Igm Globulins human with papaína. *Journal of Inmunoquímica*, 3 (4), 144-153.
- 30.- Montes, M., y Magaña I. (2002). Enzimas con aplicación industrial. *Avance y perspectiva*, 21(1), 279-282.
- 31.-Pastor, S., Fuente, B., y Ruiz, M. (2006) *Cultivos sub utilizados en el Perú: Análisis de las políticas públicas relativas a su conservación y uso sostenible*. Perú: Asociación Civil Pro Uso Dicersitas – PROUD. Sociedad Peruana de derecho Ambiental. The Global Facilitation Unit for Underutilised Species.
- 32.- Proexant, Producción de exportaciones agrícolas no tradicionales. (2005). El cultivo de la papaya. Recuperado de: <http://www.proexant.org.ec/Manual%20de%20papaya.htm>.
- 33.-Ramírez, A. (1999) *Biodiversidad de la zona arqueológica de Wari*. Instituto de

investigación UNSCH. Ayacucho – Perú

- 34.-Ramírez, A., Aucasime, L. y Magallanes, C .(1998). *Biodiversidad de la zona arqueológica de Wari*. Ayacucho : Instituto de investigación – UNSCH. Ayacucho, Perú.
- 35.-Reshmi, R., Sanjay, G., Sugunan, S. (2006) *The diatoms. Biology and Morphology of the genera*. Cambridge University press, UK
- 36.-Round, F. E. y Crawford, R. M. (1990) *The Diatoms. Biology and Morphology of the Genera*. Cambridge University Press, UK.
- 37.-Segel, I. *Cálculos de bioquímica*. (1990). España: Editorial Alahambra.
- 38.-Sheldom, R.A., Van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how? *Chem. Soc. Rev.* 42, 6223-6225
- 39.- Silva V, Letícia M. De Marco, Wendel O. (2007). Estudio comparativo de la inmovilización de la pancreatina y de la papaína en alúmina y carbón activado utilizando suero como sustrato. Departamento de Alimentos, Facultad de Farmácia, Universida de Belo Horizonte, Brasil. *Diario de las ciencias aplicadas del mundo*, 2 (3), 175-183.
- 40.-Stone, M. B., Merrick, M. A., y Ingersoll, C. D. (2002). Preliminary Comparison of Bromelain and Ibuprofen for Delayed Onset Muscle Soreness Management. *Clin J Sport Med.*, 12(1), 373 - 378.
- 41.-Trevan, M., Boffey, S., Goulding, H.; y Stanbury, P. (1990). *Biotecnología: Principios biológicos*. España: Editorial Acribia.
- 42.-Udod M., Storozhuk T., Trofimenko S., Shabash E., y Markelov S. (1983) Effect of proteolytic the enzyme papain on the body organs and systems of experimental animals. *Farmakol Toksikol*, 46 (2), 95-98.
- 43.- Valbuena De La Fuente, Felicismo (2010). Reseña de América Latina, 1810-2010. Filosofía, política y religion en el espacio antropológico. Cuadernos de Información y comunicación, 15, 326-327. Disponible en: <https://redalyc.org/articulo.oa?id93520400020>
- 44.- Viviane, D; Silva, L; De Marco, W; Afonso, D; López, M; Marialice P; y Silvestre, C. (2008) Comparative Study of the Immobilization of Pancreatin and Papain on Activated Carbon and Alumina, Using Whey as Protein Substrate. Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil
- 45.-Wiseman, A. (1991). *Manual de Biotecnología de las enzimas*. Editorial Acribia, Zaragoza España.
- 46.-Zhu, Y., Kaskel, S., Shi, J., Wage, T., Van pee, K.H. (2007) Immobilization of tramtes versicolor laccase on magnetically separable mesoporus silica spheres. *Chem. Mater.* 19, 6408-6413
- 47.-Zhuang D., Butterfield A. (2008). *The studies of the denaturation of the active-site labeled papaína to use electron*. E.E.U.U: Department of chemistry. Center science of the membrans. Universidad de Kentucky

ANEXOS

Anexo 1

Frutos de *Carica papaya* L



Anexo 2

Proceso de incisión del fruto de *Carica papaya L*



Anexo 3

Obtención del latex de *Carica papaya L*



Anexo 4

Recojo del látex de *Carica papaya* L y estabilización en buffer fosfato



Anexo 5

Recojo de bloques de tierra de diatomeas para molienda y tamizado



Anexo 6

Partículas de tierra de diatomeas



Anexo 7

Preparación de las columnas de inmovilización de tierra de diatomeas



Anexo 8

Absorbancias de las muestras eluidas con papaína inmovilizada en tres soportes a 25°C

SILICA			
	pH 7,0	pH 7,5	pH 8,0
0	0.658	0.658	0.658
1	0.651	0.650	0.657
2	0.629	0.626	0.654
3	0.616	0.607	0.651
4	0.596	0.589	0.647
5	0.572	0.565	0.641
6	0.561	0.551	0.639
7	0.541	0.534	0.632
8	0.526	0.519	0.631
9	0.499	0.492	0.627
10	0.483	0.447	0.622
ALUMINA			
	pH 7,0	pH 7,5	pH 8,0
0	0.658	0.658	0.658
1	0.651	0.647	0.657
2	0.638	0.636	0.655
3	0.629	0.624	0.653
4	0.621	0.614	0.651
5	0.611	0.603	0.649
6	0.598	0.592	0.647
7	0.583	0.585	0.647
8	0.576	0.573	0.645
9	0.562	0.558	0.645
10	0.554	0.548	0.644
TIERRA DE DIATOMEAS			
	pH 7,0	pH 7,5	pH 8,0
0	0.658	0.658	0.658
1	0.650	0.643	0.656
2	0.633	0.629	0.653
3	0.618	0.616	0.651
4	0.601	0.598	0.649
5	0.592	0.582	0.644
6	0.571	0.568	0.641
7	0.555	0.551	0.639
8	0.537	0.536	0.637
9	0.523	0.526	0.635
10	0.516	0.508	0.631

Anexo 9

Absorbancias de las muestras eluidas luego de ser tratadas papaína inmovilizada en tres soportes a 30°C

SILICA			
	pH 7,0	pH 7,5	pH 8,0
0	0.658	0.658	0.658
1	0.630	0.611	0.656
2	0.602	0.572	0.650
3	0.574	0.537	0.647
4	0.531	0.498	0.644
5	0.509	0.451	0.641
6	0.482	0.417	0.636
7	0.449	0.366	0.633
8	0.411	0.319	0.628
9	0.399	0.277	0.625
10	0.377	0.235	0.618
ALUMINA			
	pH 7,0	pH 7,5	pH 8,0
0	0.658	0.658	0.658
1	0.651	0.652	0.657
2	0.641	0.647	0.654
3	0.612	0.623	0.654
4	0.586	0.601	0.654
5	0.561	0.577	0.648
6	0.542	0.556	0.647
7	0.526	0.540	0.645
8	0.499	0.526	0.645
9	0.473	0.508	0.645
10	0.452	0.497	0.645
TIERRA DE DIATOMEAS			
	pH 7,0	pH 7,5	pH 8,0
0	0.658	0.658	0.658
1	0.646	0.627	0.656
2	0.621	0.584	0.652
3	0.601	0.549	0.649
4	0.588	0.515	0.649
5	0.552	0.473	0.643
6	0.523	0.446	0.639
7	0.487	0.401	0.638
8	0.456	0.351	0.636
9	0.421	0.315	0.629
10	0.391	0.276	0.621

Anexo 10

Absorbancias de las muestras eluidas luego de ser tratadas con papaína inmovilizada en tres soportes a 35°C

SILICA			
	pH 7,0	pH 7,5	pH 8,0
0	0.658	0.658	0.658
1	0.611	0.616	0.656
2	0.598	0.574	0.654
3	0.573	0.539	0.650
4	0.566	0.511	0.647
5	0.541	0.459	0.645
6	0.529	0.432	0.640
7	0.511	0.369	0.632
8	0.497	0.334	0.626
9	0.474	0.300	0.624
10	0.471	0.288	0.616
ALUMINA			
	pH 7,0	pH 7,5	pH 8,0
0	0.658	0.658	0.658
1	0.657	0.654	0.657
2	0.641	0.649	0.654
3	0.631	0.629	0.654
4	0.624	0.611	0.653
5	0.607	0.587	0.652
6	0.583	0.564	0.650
7	0.571	0.548	0.646
8	0.563	0.534	0.644
9	0.546	0.517	0.641
10	0.531	0.501	0.639
TIERRA DE DIATOMEAS			
	pH 7,0	pH 7,5	pH 8,0
0	0.658	0.658	0.658
1	0.642	0.629	0.655
2	0.634	0.585	0.650
3	0.622	0.557	0.647
4	0.607	0.524	0.644
5	0.590	0.489	0.637
6	0.582	0.473	0.634
7	0.571	0.449	0.627
8	0.562	0.410	0.621
9	0.547	0.315	0.610
10	0.526	0.295	0.600

Anexo 11

Ensayos de la actividad enzimática de la papaína

