

UNIVERSIDAD IBEROAMERICANA
Incorporada a la U. N. A. M.
ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA DETERMINACION
DE PAPAIA EN MEZCLAS COMERCIALES.

TESIS

PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO

MARIA DEL CARMEN BECERRIL MARTINEZ

MEXICO, D. F. 1964

11589



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD IBEROAMERICANA

Incorporada a la UNAM.

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA DETERMINACION DE PAPAINA
EN MEZCLAS COMERCIALES**

TESIS

**PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO**

MA. DEL CARMEN BECERRIL MARTINEZ

MEXICO, D F — 1964.

**A MIS PADRES, HERMANO
Y FAMILIARES.**

11589

A MI ESPOSO.

**A MIS MAESTROS, AMIGOS
Y COMPAÑEROS.**

**Al Personal del Laboratorio de Control de la
Cía. Medicinal "La Campana" y especialmente
a la Srta. O F B. Ma. de Jesús Rubio.**

SUMARIO :

1.— INTRODUCCION .

2.— INFORMES GENERALES SOBRE PAPAÑA.

**3.— METODOS A USAR EN LAS DETERMINACIONES Y
BASES DE DICHS METODOS.**

4.— RESULTADOS DE LAS PRUEBAS EFECTUADAS

5.— CONCLUSIONES.

6.— BIBLIOGRAFIA

I.—INTROUCCION.

I— INTRODUCCION .

La papaína es una planta de origen natural que tiene propiedades que pueden ser útiles en la industria, en el hogar en la medicina, etc. Además el uso de la papaína en productos farmacéuticos va en aumento cada día y se hace más necesario encontrar un método para su valoración y poder calcular en forma rápida y sencilla su cantidad.

En la actualidad existen varios métodos analíticos para dicha determinación. El propósito de este trabajo es llevar a cabo una selección de ellos, desde el punto de vista exactitud, rapidez y aplicabilidad.

Entre los métodos propuestos para el cuantitativo de esta sustancia y después de un estudio preliminar de su conveniencia, se llegó a la conclusión de que dos de ellos

Método de Coagulación

Método Químico

serían los que podían ser más aplicables para las determinaciones cuantitativas y sobre estos dos, se dirigen en los pasos para este trabajo.

El final que nos proponemos llegar con este estudio, es escoger de estos dos, a nuestro parecer, aquel que tenga más conveniencia de aplicación.

II.— INFORMES GENERALES
SOBRE PAPAINA.

II.— INFORMES GENERALES SOBRE PAPAINA.

Breves datos históricos.

Los primeros resultados experimentales de la acción digestiva del jugo de papaya aparecieron en 1874. En 1878 Wittmack (1) reportó las propiedades digestivas del jugo terroso de la papaya. En 1879 Peckolt re-examinó un precipitado que él había hecho años antes del jugo fresco de la papaya sin madurar y confirmó la digestión. Más tarde, en el mismo año Wurtz y Bouchet publicaron los resultados de un producto purificado que denominaron papaina.

Fuente y preparación de papaina.

La planta *Carica papaya* es originaria de Centro América o del Oeste de la India. El crecimiento más abundante de esta planta están en Ceilán, Islas Hawaianas, Sureste de Florida, América tropical y otros lugares tropicales.

Se plantó primeramente para la producción de fruta madura como artículo alimenticio, y más tarde también con el propósito de producir papaina.

La Carica papaya se considera una hierba gigante, más bien que un árbol, llegando hasta alcanzar una altura de siete metros y medio. El tronco no tiene ramas laterales, pero a veces se divide formando tallos erguidos, en la parte superior lleva las hojas que son grandes y palmolobuladas en forma de umbrela, suelen alcanzar una dimensión de 60 cm. Están sostenidos por pecíolos huecos de 30 cms. o más. La corteza es lisa, de color gris, señalada con las cicatrices que dejan las hojas al caer. Hay ciertas variedades diferentes: unas de otras de acuerdo con la especie de flores que produzcan.

La papaina se obtiene industrialmente por la deshidratación del jugo o leche que transpira la fruta verde del papayo.

(2) Para obtener este jugo se hacen incisiones a lo largo del tronco dándole la forma de "V", en el vértice se coloca una probeta procurando que entre un poco en la corteza. Se deshidrata y se pulveriza.

Varios métodos han sido usados para su purificación. Por precipitación fraccionada con alcohol, acetona, con sales neutras como sulfito de sodio y amonio, etc. Se emplean también métodos de adsorción selectiva con caolín, hidróxido de aluminio, etc. y se eluye con soluciones de determinado pH y fuerza iónica.

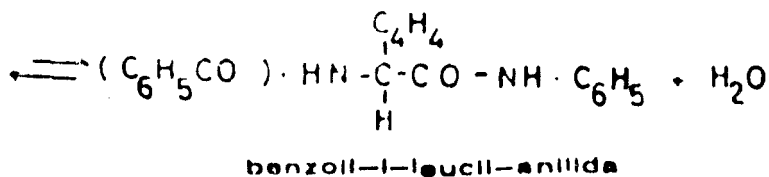
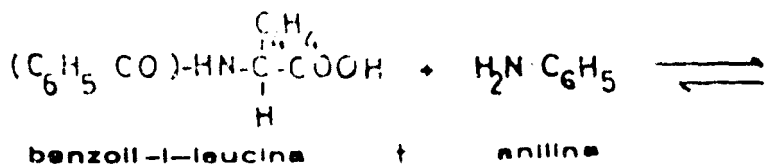
La papaina así purificada se presenta bajo la forma de polvo blanco de olor ligero característico de sabor astringente y dulzaino. Es completamente soluble en agua, la solución acuosa forma mucha espuma por agitación.

Propiedades.

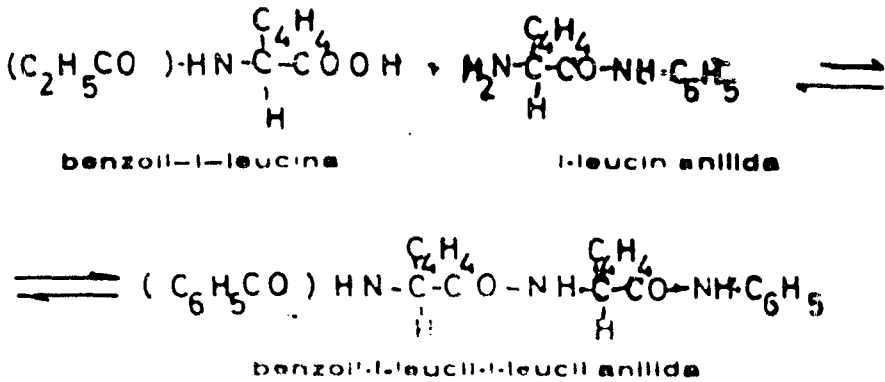
(1) La papaína es el latex seco íntegro purificado de la papaya verde. Es un polvo blanco o color crema con olor característico. Se clasifica en el grupo de proteinasas. Ha sido recientemente considerada como una endopeptidasa con acuerdo a una nueva clasificación por Bergman. La especificidad de la papaína y algunas otras catepsinas fue encontrada ser la misma que la tripsina y el nombre de tripsinasa fue por consiguiente dado a ésta enzima.

(2) La papaína de Wurtz y Bouchet como algunos autores la llaman actúa en medio alcalino, neutro o ligeramente ácido y a diferencia de la tripsina y del fermento de la levadura descompone la gelatina y la caseína sin auxilio de activadores. Las papaínas son proteinasas de las células de los tejidos vegetales.

(4) La papaína es una enzima específica de los compuestos I cataliza activamente la síntesis de la benzil leucil anilida por reacción de Benzil I leucina con anilina, la reacción termina en cinco minutos, separándose el producto en forma sólida.



Otro ejemplo:



La especificidad de las proteasas, tanto en la descomposición como en la formación de las cadenas peptídicas, consiste en que actúan desdoblado o combinando selectivamente enlaces peptídicos.

Su máxima actividad proteolítica la presentan entre los valores de pH 4 y 7

Las soluciones acuosas de la papaína son transparentes e incoloras, se enturbian al hervirlas sin que nunca llegue a formarse el menor coágulo; éstas soluciones acuosas ejercen marcada acción sobre la luz polarizada, desviando el plano de polarización hacia la izquierda.

Disuelve y transforma los albuminoides en solución neutra o ligeramente alcalina o en medio ligeramente ácido

Cuando se inyecta en la circulación a dosis grandes paraliza el corazón

La papaína se puede analizar cualitativamente por reacciones características, por ejemplo, con solución de cloruro platínico y con solución de ácido táncico, con los cuales da precipitados abundantes. El reactivo de Millon da precipitado el cual, en caliente posee una marcada coloración roja.

Existen dos enzimas cristalinas altamente activas; papaína cristalina y quimopapaína; han sido recientemente aisladas de el producto íntegro del latex.

El peso molecular de la papaína cristalina ha sido determinado como 27,000 aproximadamente.

Actividad enzimática.

Las actividades más notables son las proteolíticas y las de coagulación de la leche, las cuales se manifiestan probablemente mediante el mismo componente enzimático de la papaína.

Naturaleza química y grupo activo.

La acción proteolítica de la papaína fué mostrada recientemente y se asoció con los constituyentes proteicos del latex de papaya (de estos constituyentes proteicos la mitad aún no se conoce).

Cuidadoso análisis del latex seco de Carica papaya muestra que contiene humedad y sustancias solubles en agua las cuales son monosustituidas en su mayoría por proteínas de globulina, albúmina, proteasa y peptona. El precipitado del latex obtenido por saturación con sulfato de amonio ha mostrado contener una fracción grandemente enzimática.

Las sustancias extraídas contienen, materia coloreada, restos vegetales; ceras dura y blanda, resinas dura y blanda resinas volátiles, algunas sustancias de la naturaleza de los ácidos grasos y pectosas, que poseen propiedades corrosivas y pueden ser removidas con éter o cloroformo.

El contenido total de sulfuro, en la enzima es de $1.2 \pm 0.1\%$. El contenido de nitrógeno es de $15.5 \pm 0.1\%$. No obstante la tirosina se encontró en hidrólisis ácida de papaina pura, pero no se encontró en el espectro de absorción ultravioleta de una solución de papaina intacta. Con técnicas perfeccionadas se ha mostrado que existe en la molécula de papaina intacta: tirosina y triptofano en una relación no menor de 4:1. No se encontró fósforo en la molécula de papaina cristalina.

La naturaleza del grupo activo en la actividad proteolítica se encuentra todavía en controversia. El grupo sulfhidrilo ha sido sugerido como el grupo activo de la papaina, la cual se hace responsable de la inactivación reversible por agentes oxidantes.

Otros estudios han dejado como conclusión que el grupo sulfhidrilo es esencial solamente para la actividad de una parte del sistema proteolítico en la papaina; algunos otros grupos presentes son esenciales para todo o parte del sistema proteolítico.

Algunos reportes desmienten totalmente la presencia de grupos SH — S-S en la papaina y consideran que el grupo aldehído es esencial para las actividades proteicas y peptidicas de la papaina.

El grupo dienol se considera como necesario para la actividad de la enzima mientras que el grupo SH con la papaina sólo actúa como indicador de la oxidación y reducción de otros grupos esenciales de la enzima susceptibles a oxidación y reducción.

Actividad de la papaina y desnaturalización de la proteína.

El estudio de la digestión de la albumina por papaina revela que la proteína coagulada por calor fué digerida con mayor dificultad que la no coagulada.

La desnaturalización de la proteína puede ocurrir antes que la molécula se rompa en fracciones por la enzima proteolítica. Esta idea es apoyada por estudios de la acción de la papaina en diferentes proteínas. Por los medios de ultracentrifuga la digestión de la papaina en ovoalbúmina cristalina se estudió y se encontró que el primer cambio de la proteína nativa fué la producción de moléculas de forma altamente asimétricas sin carga ni peso molecular.

Factores que influyen en la acción de la papaina.

TEMPERATURA — La papaina como enzima proteolítica es marcadamente termoc estable. Cuando está en forma seca resiste destrucción por calor a 100°C por 3 horas, pero en solución se inactiva por calentamiento durante 30 minutos a 83.5°C. Mientras que la papaina es proteolíticamente activa a los 10°C, su acción óptima se observa a 70°C. Muchos traba-

jadores han usado la temperatura de 40 C para los experimentos de papaina pero probablemente es mas alta su temperatura óptima: 60-65 C.

pH DEL MEDIO.—La papaina es activa dentro de una zona de pH ácido, neutro o alcalino. El pH óptimo de la acción proteolítica varia de acuerdo con la naturaleza del sustrato; pH 5 para gelatina, peptona y sustratos sintéticos simples, cerca de la **neutralidad** para fibrina, caseína y hemoglobina.

El concepto de que el pH óptimo de proteólisis para la papaina coincide con el punto isoelectrico de los sustratos fué propuesto por Willstätter y su grupo.

En recientes experimentos con papaina cruda se encontró que aproximadamente el 50% de las bandas peptídicas de caseína fueron rápidamente hidrolizadas a pH 5, liberando 30% de los aminoácidos como aminoácidos libres.

Bajo condiciones comparables a pH 7, sólo 25% de las bandas peptídicas fueron rotas, aunque el pH posterior es el óptimo para la relación inicial de digestión.

Efecto de oxidación y reducción.

(1) Una de las características de la actividad proteolítica es su inactivación oxidativa reversible. La papaina es inactivada por varios agentes oxidantes, como oxígeno atmosférico y reactivada por agentes reductores incluyendo ácido cianhídrico. Esta reacción reversible ha sido interpretada con bases en la naturaleza tiol de la enzima.

(1) En estudios recientes usando técnicas estrictamente anaerobias y preparaciones de enzimas altamente purificadas se concluyó que la papaína existe en dos formas inactivas, las cuales son interconvertibles por procesos de oxidación y reducción, sin embargo, la activación de la enzima no es llevada a cabo por tales procesos sino por la presencia de una coenzima o de ácido sulfhídrico, ácido cianhídrico, cisteína o glutatión.

La forma S-O-S no es activada por ácido cianhídrico pero puede ser convertida mediante el ácido sulfhídrico en la forma S-S , la cual es activada por ácido cianhídrico o ácido sulfhídrico. Esta activación reversible de papaína mediante procesos de oxidación-reducción fueron debidos al efecto de las impurezas acompañantes en la preparación de la enzima.

Efecto de agentes físicos.

Aparte del calor, las radiaciones ultravioleta se mencionan como agentes físicos que tienen algún efecto sobre la papaína. Se ha mostrado como primer activador de la papaína a las radiaciones ultravioleta por su efecto reductor.

Efecto de varios agentes químicos y biológicos.

Con respecto al efecto de otras sustancias en la acción proteolítica de papaína con sustratos químicos y biológicos se tiene que el ácido yodoacético causa inactivación irreversible de papaína por destrucción del grupo sulfhidrilo o algunos otros grupos esenciales. Ciertos iones metálicos tales como Ca , Ag , Au , Zn , Cd , Hg son inhibidores a la acción

de papaina, mientras que otros metales no tienen efecto. Tales observaciones dejaron la teoría que la acción de activadores de papaina es remover esos iones metálicos tóxicos. Esta teoría no es aceptada por algunos trabajadores, sin embargo, el efecto de compuestos de forma mercaptídica en papaina ha sido brevemente discutido.

La actividad proteolítica de la papaina se deteriora cuando esta en solución y se encuentra almacenada. Su inestabilidad ha sido atribuida al efecto de oxidación y a la presencia de impurezas, las cuales, pueden tener inhibidores o un efecto destructivo en papaina. El factor destructivo es termoresistente y destruye papaina en solución por un proceso oxidativo.

(1) La papaina contiene un sistema proteolítico complicado. Las teorías "proteínasa y peptonasa" han sido dadas por algunos autores después de estudios exhaustivos. No se sabe con certeza si dentro de la papaina existe una mezcla de enzimas, o una simple poseyendo varios centros, los cuales, son activados de diferentes maneras.

La sangre es coagulada por adición de papaina, debido a su acción directa sobre el fibrinógeno. En condiciones apropiadas la papaina destruye también ciertas otras enzimas como insulina, ciertas bacterias, virus y también anticuerpos.

Metodos de ensayo para papaina han sido discutidos, lo mismo que unidades diferentes de actividad de papaina.

Usos.

La papaina fué primero traída a América como medicina, pero ahora es usada por numerosos propósitos comerciales e industriales, especialmente para fabricar alimentos tiernos.

En medicina la papaina ha sido usada como enzima digestiva; internamente para ayudar a la digestión, y externamente ha sido aplicada para ciertos tumores crecidos con buenos resultados.

La aplicación intraperitoneal de la papaina para prevención de adherencias post-operativas ha sido usada aparentemente con buenos resultados, aunque todavía es dudoso.

También tiene uso como agente antiinflamatorio.

**III.—METODOS A USAR EN LAS DETERMINACIONES Y BASES
DE DICHS METODOS.**

III.—METODOS A USAR EN LAS DETERMINACIONES Y BASES DE DICHS METODOS.

Método de Coagulación.

La Coagulación de la leche o acción coagulante de la papaina fue probablemente primero estudiada por Wittmack (1) y poco después por Peckolt, quienes dieron a conocer los constituyentes proteicos de la papaina, los cuales no se han podido separar. Fue reportado que no hay diferencia en la intensidad de la coagulación de leche fresca de vaca o leche hervida, pero se encontró que la leche hervida coagulaba mucho más rápidamente que la leche cruda.

El ensayo de papaina por medición de la coagulación de la leche en leche ha sido ampliamente usado, resultando una ayuda valiosa, simple y rápida para describir la actividad del complejo enzima presente en papaina.

Este método se basa en la propiedad que tiene dicha enzima de coagular la leche, usando un patrón de papaina cuya actividad se conoce y relacionándola con la muestra. El mecanismo de la coagulación de la leche no se conoce exactamente pero se cree que se debe a la acción de la papaina sobre la caseína de la leche rompiendo las uniones peptídicas ya sea alterando grupos azidos que cambian el pH del medio o bien, desnaturando la proteína. En los 2 casos se forma el coágulo de caseína.

La desnaturalización consiste en esencia en la ruptura de los enlaces cruzados de las cadenas peptídicas (unión por atracción electrostática de grupos carboxilo libres y amino libres) con modificaciones importantes en su comportamiento físico-químico y fisiológico.

La actividad de la coagulación de la leche se considera asociada al grupo SH libre que fue sugerido como el grupo activo de la papaína.

La propiedad de coagular la leche por la papaína está en relación directa con la concentración de la enzima y esta a su vez es inversamente proporcional al tiempo que tarda en coagular la leche.

Esto se puede expresar por la siguiente ecuación que graficada da una línea recta:

$$E = \frac{K}{T}$$

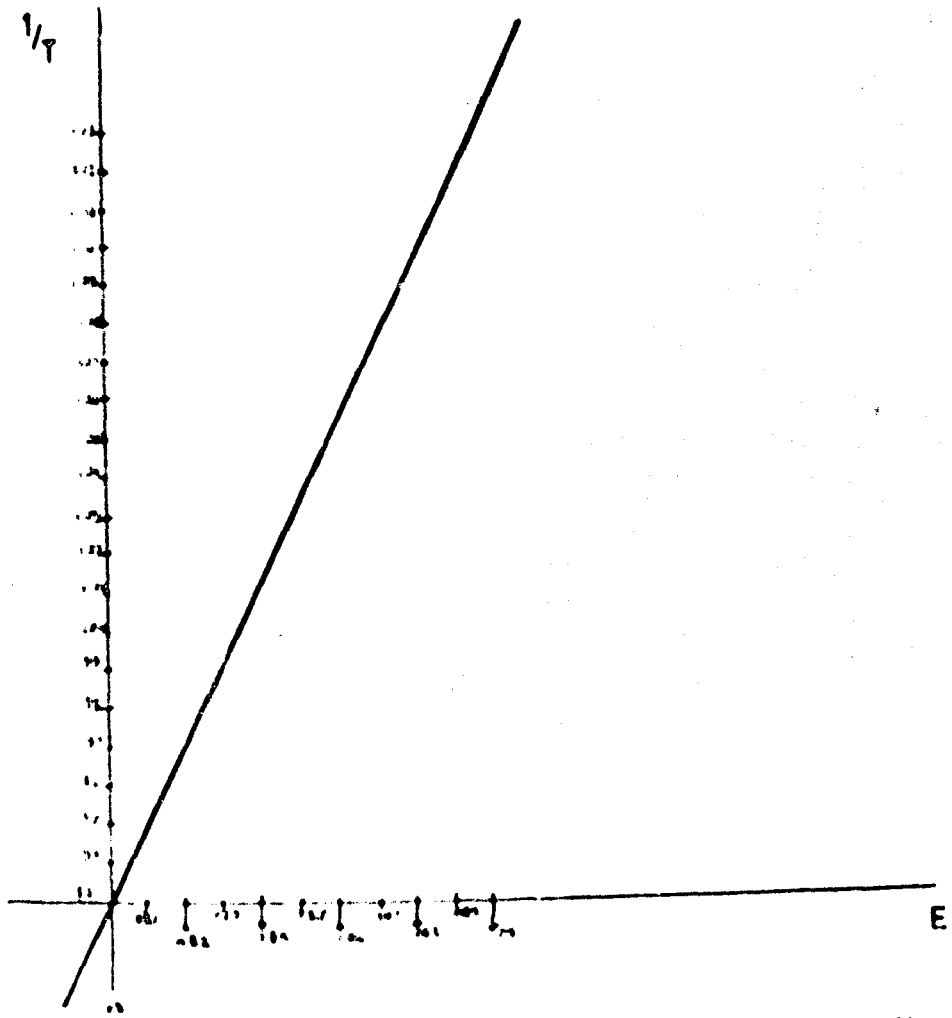
donde:

E = peso de la enzima en miligramos

T = tiempo

Reactivos

PREPARACION DEL SUSTRATO DE LECHE.—Pesar 100 g de leche en polvo comercial y transferir a una licuadora. Añadir 425 mililitros de solución amortiguadora diluida y homogeneizar a baja temperatura.



GRAFICA DE LA ECUACION $E = \frac{K}{T}$

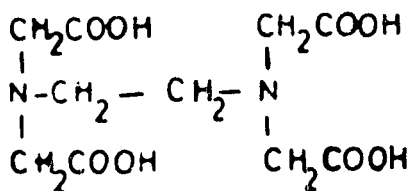
por 30 minutos. (La temperatura de la licuadora no debe ser mayor de 30 C) Añadir unas gotas de alcohol octílico y tolueno. se deja reposar por dos horas antes de ser usada

Medir alícuotas de 25 mililitros en tubos de ensayo y llevarlos a una temperatura constante de 40 C por aproximadamente media hora antes de ser usada. Este reactivo debe ser fresco.

SOLUCION AMORTIGUADORA CONCENTRADA — Mezclar 2 volúmenes de ácido acético ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-COOH}$) 1N con un volumen de hidróxido de sodio 1N y ajustar el pH de la solución resultante a 4.5 con adición de ácido acético 1N o solución de hidróxido de sodio 1N

SOLUCION AMORTIGUADORA DILUIDA — Diluir 2 volúmenes de solución amortiguadora concentrada a 15 volúmenes con agua. (425 mililitros son requeridos para 100 g de leche).

SOLUCION AMORTIGUADORA DE CISTEINA — Disolver 6.3 g. de fosfato disódico anhidro (Na_2HPO_4) en 200 mililitros de agua. Disolver 6.1 g. de clorhidrato de cisteína en 400 mililitros de agua. Disolver 2.8 g. de tetracetato disódico etilén diamina (



en aproximadamente 150 mililitros de agua. Mezclar las soluciones de fosfato y EDTA y añadirle poco a poco la solución de cisteína. Diluir a 1 L.

PREPARACION DE LA MUESTRA —Pesar aproximadamente 4 g. de muestra y pasarlo a un matraz volumétrico de 100 mililitros y disolver con solución de cisteína. Cuando la solución sea completa aforar a volumen con solución de cisteína.

PREPARACION DEL PATRON —Pesar aproximadamente 0.25 g. de patrón (equivalente a 3 U mg) y disolver en solución de cisteína hasta 100 mililitros.

PROCEDIMIENTO —Medir 2 mililitros de la preparación de la muestra en un tubo que contiene 25 mililitros de leche a 40°C. Tomar el instante en que la muestra toca la superficie del sustrato de leche. Agitar el tubo de ensayo durante la adición de la muestra. Tapar el tubo con tapón de hule e inmediatamente colocar a baño maría a 40°C en una posición horizontal. Sujetar el tubo a un movimiento rotatorio. Cuando el punto final se acerca aumenta la viscosidad de la suspensión. El punto final ocurre cuando una granulación aparece en la pared del tubo de ensayo. A este instante tomar el tiempo recorrido. Repetir el procedimiento agitando la muestra entre cada determinación.

Determinar el tiempo del patrón de la misma manera, sustituyendo una cantidad igual de esa preparación por la preparación de la muestra.

Cálculos.

Problema:

$$\frac{M \times 25}{W \times T} = U \text{ mg en el problema.}$$

donde:

- M — Factor de la leche
- 25 — Volumen en mililitros de la muestra de leche.
- W — peso de la muestra en mg
- T — Tiempo en minutos

Patrón

$$\frac{M \times 25}{W \times T} = U \text{ mg en el patrón}$$

donde.

- M — Factor de la leche
- 25 — Volumen en mililitros del sustrato de leche.
- W — Miligramos de patrón usados en la alícuota.
- T — Tiempo en minutos

U mg en el patrón ----- Actividad de papaína en el patrón.

U mg en el problema ----- X

X ----- Actividad de papaína en el problema

El factor de la leche M está establecido y periódicamente verificado por ensayos con una muestra patrón

Cálculo —

$$M = \frac{U \text{ mg} \times W \times T}{25 \times 100}$$

$$M = 1.7$$

NOTAS — Se puede usar cualquier clase de leche en polvo comercial ya que las determinaciones del problema y del patrón se hacen en el mismo sustrato.

El tiempo de esa determinación debe caer dentro de los límites de 60 a 250 segundos para dar resultados reproducibles, los cuales, se pueden considerar válidos. Si la determinación cae fuera de éstos límites preparar una solución fresca haciendo un ajuste en el tamaño de la muestra para traer el tiempo dentro de ellos. Para los cálculos son válidas las determinaciones cuadruplicadas en las cuales el tiempo varía más o menos 6 %.

EJEMPLO.—

Tiempo en segundos:

Problema	Patrón
60	223
61	223
59	224
60	223
<hr/>	<hr/>
240	893

Tiempo promedio en minutos:

Problema — 1.0

Patrón — 3.72

Peso del problema en 1 ml. de alícuota:

40 mg

Peso del patrón en 1 ml. de alícuota

25 mg

Factor de la leche: 1.7

Actividad del patrón: 0.3 U/mg

$$\frac{1.7 \times 25}{1 \times 40} = 1.06 \text{ U/mg en el problema}$$

$$\frac{1.7 \times 25}{3.72 \times 25} = 0.456 \text{ U/mg en el patrón}$$

$$0.456 \text{ ————— } 0.3$$

$$1.06 \text{ ————— } X$$

$$X = 0.997 \text{ U/mg}$$

Actividad de papaina en el problema:

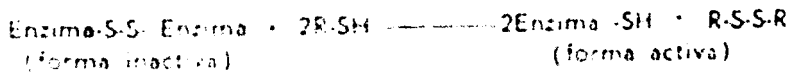
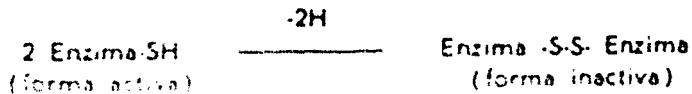
0.997 U/mg

METODO QUIMICO

Es un hecho curioso que mientras el ácido cianhídrico y el ácido sulfhídrico son venenosos para la generalidad de las enzimas, resulta marcadamente activadores para la papaína. Se cree que tal activación proceda del envenenamiento que dichos ácidos producen en algunos de los grupos constituyentes de dichas enzimas, que de suyo debilitan la energía hidrolizante de estas. Mas en particular la acción del sulfhidrilo sobre la papaína la interpretan Bersini y Lingentani como la reducción de un grupo disulfuro contenido en la enzima en forma oxidada.

La papaína es activada por los grupos SH pero no se posee una explicación del mecanismo del fenómeno.

REPRESENTACION



Este método se basa en la acción de la papaína sobre la caseína, rompiendo las uniones peptídicas y liberando grupos aminoácidos que son valtables en la solución de hidróxido de sodio.

En este método además de determinar la actividad de la papaína se puede obtener la activación de la enzima por H_2S sobre dicha enzima.

La papaína de la muestra no activada, al actuar sobre la caseína libera un número menor de grupos aminoácidos (debido a su carácter de proteinasa) y libera un mayor número de grupos aminoácidos que se valoran con solución de hidróxido de sodio.

La papaína de la muestra activada, al actuar sobre la caseína libera un número mayor de grupos aminoácidos (la papaína fue previamente activada por 1000 unidades en solución de hidróxido de sodio).

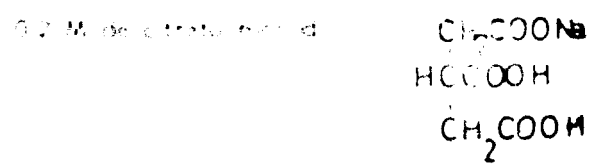
La diferencia de los aminoácidos de las 2 muestras nos da la actividad de la papaína ya que esta es relación directa con los grupos ácidos liberados y estos a su vez con la concentración de la enzima.

Un mililitro de solución de hidróxido de sodio 0.1N corresponde a 100 mg. de actividad de papaína.

Reactivos

SOLUCIÓN DE CASEINA - Para esta solución de caseína, para ello se pesa 60 g. de caseína en poca agua en un mortero y añadir gradualmente 60 mililitros de hidróxido de sodio 0.1N y agua hasta volumen total de un litro. Dejar la solución viscosa 30 minutos en un baño de agua templada y filtrar en un papel filtro y en un filtro de vidrio.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE CITRATO - Preparar una solución



100% neutralización parcial con ácido cítrico e hidróxido de sodio.

SOLUCION PARA TITULAR.—Solución 0.1 N de Hidroxido de sodio.

INDICADOR.—Solución de timoftaleína al 10%.

Preparación de la muestra.

INACTIVADA—Si la enzima preparada es sólida, pulverizar en un pequeño mortero con agua fría recién hervida hasta una pasta homogénea. Entonces suspender en agua fría la preparación original en porciones de 0.04 g/ml de agua (4g en 100 mililitros de agua). Centrifugar 5-10 minutos la suspensión, descartar el sedimento.

ACTIVADA—Proceder como la anterior pero usando agua sulfhídrica en lugar de agua hervida. Después de centrifugar incubar la solución de enzima una hora a 40 C para activación completa.

Procedimiento.

Colocar 10 mililitros de solución de caseína y pequeñas bolas de vidrio de 4 mm de diámetro en cada una de las botellas de 125 mililitros y poner botellas y contenido a 40 C. Añadir volumen deseado de solución de enzima preparada pero no menor a 4 mililitros.

Si esa cantidad es insuficiente, preparar más solución concentrada de la enzima. Añadir inmediatamente 3 mililitros de la solución amortigua-

dora (el pH del sistema debe ser entonces 5.0 ± 0.1) Agitar vigorosamente la botella pocos segundos y colocar a baño maría a temperatura constante de 40 C.

Incubar la mezcla 20 minutos a 40 C contando el tiempo de adición de la solución amortiguadora. Añadir un mililitro de indicador y empezar a titular con solución de hidróxido de sodio. Tan pronto como aparezca un color intenso agitar las botellas hasta que el color se atenúe o completamente desaparezca.

Cuando esté toda la caseína disuelta, pasar el contenido de las botellas a un matraz de 400-500 mililitros. Añadir bastante solución de hidróxido de sodio para restaurar el color azul, entonces añadir 175 mililitros de alcohol hirviendo. Cuidadosamente añadir más Hidróxido de sodio hasta que un color azul pálido persista en la solución.

Para la muestra activada el control de la titulación se hace exactamente como se describe pero inmediatamente después de la adición del amortiguador sin ningún tiempo de incubación.

Cálculos.

Cada mililitro de solución de hidróxido de sodio 0.1N equivale a 1 U mg de actividad de papaina.

NOTAS: Para cantidades pequeñas de enzima la titulación es función de línea recta de cantidades de papaina usada.

Para precisión del trabajo se determina ésta línea recta haciendo varias titulaciones con cantidades diferentes de enzima.

La actividad enzimática se mide por milimoles de sustrato desdoblados en la unidad de tiempo.

Ejemplo.—

Peso de la muestra: 40 g

Mililitros de solución de Hidróxido de sodio gastados en la muestra no activada:

6.95

Actividad en la muestra: 6.95 U/mg.

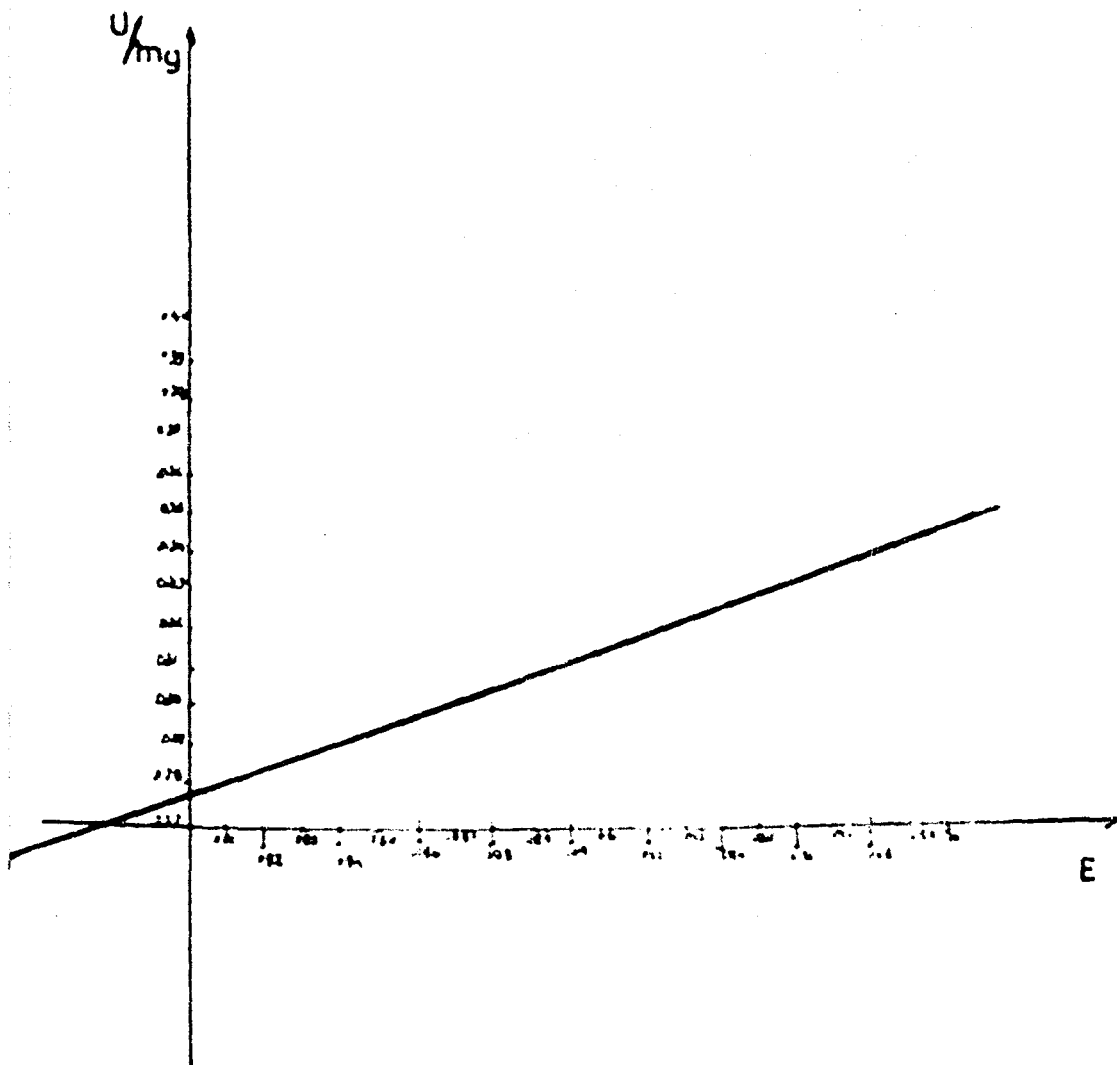
Mililitros de solución de Hidróxido de sodio gastados en la muestra activada:

8.2

$$\begin{array}{r} 8.2 \\ \hline 6.95 \\ \hline 1.25 \end{array}$$

Activación de papaína producida por la solución de H_2S

1.25 U/mg



IV.—RESULTADOS DE LAS PRUEBAS EFECTUADAS.

IV.—RESULTADOS DE LAS PRUEBAS EFECTUADAS.

Primeramente se hicieron determinaciones con papaína pura (peso de la muestra = 4 g.) obteniéndose lo siguiente

METODO DE COAGULACION
0.697 U. mg.

METODO QUIMICO
0.695 U. mg.

Para efectuar las determinaciones se preparó una mezcla (30 Kg) que contenía glucosa, colorantes, sabor de menta piperita, sabor de yerba buena, sabor de salicilato de metilo, ácido esteárico, estearato de magnesio, metil celulosa, azúcar, almidón y 1.2 Kg. de papaína

Peso de papaína en 4 g. de muestra = 0.16 g.

A esta mezcla se le agregó paulatinamente el porcentaje de papaína obteniéndose los siguientes RESULTADOS

	VALORES ENCONTRADOS	
	Método de Coagulación U. mg.	Método Químico U./mg.
Muestra con 0.16 g. de papaína		
	0.027	0.0265
Contenido teórico 0.0278	0.027	0.0263
	0.027	0.0264

VALORES ENCONTRADOS

Método de Coagulación Método Químico
U/mg U/mg.

Muestra con 0.1616g
de papaina

0.0277	0.027
0.0281	0.0272
0.0281	0.027

Muestra con 0.1632 g
de papaina

C. técnico 0.02843

0.02835	0.028
0.0284	0.0279
0.0284	0.028

Muestra con 0.1680 g
de papaina

C. técnico 0.02927

0.0292	0.0291
0.0292	0.02917
0.0292	0.02919

Muestra con 0.175 g
de papaina

C. técnico 0.03028

0.03028	0.03048
0.03028	0.03048
0.03028	0.03048

Muestra con 0.22 g
de papaina

C. técnico 0.034

0.0347	0.0341
0.0348	0.0341
0.0347	0.0341

VALORES ENCONTRADOS

	Método de Coagulación U/mg.	Método Químico U/mg.
Muestra con 0.24 g. de papaína.		
C. teórico 0.04182	0.0418 0.04173 0.04179	0.04172 0.04172 0.04173
Muestra con 0.28 g. de papaína.		
C. teórico 0.04879	0.0487 0.0487 0.04872	0.04869 0.04869 0.0487
Muestra con 0.32 g. de papaína.		
C. teórico 0.05576	0.0557 0.0557 0.0557	0.0557 0.05569 0.0557

V.—CONCLUSIONS.

V.—CONCLUSIONES.

Para hacer la comparación de los dos métodos se toma en cuenta su precisión, facilidad y rapidez, características éstas preferidas en todo método analítico. No se toma en cuenta la economía debido a que muchas veces es un factor secundario.

En realidad los dos métodos son fáciles en su ejecución, rápidos y bastante precisos, pero como se ve en los resultados obtenidos en el laboratorio, existe más precisión en el método de coagulación, pues en el método químico puede haber algunas pérdidas de sustancia debido a su procedimiento y a otras causas comunes en toda valoración.

Después de efectuadas las pruebas en el laboratorio se concluyó que:

El método que tiene mayor conveniencia de aplicación es el de coagulación, ya que es más rápido, resulta más fácil en su procedimiento y es bastante preciso.

Porcentaje de error en el método de Coagulación

0.96 %

Porcentaje de error en el Método Químico:

1.5 %

VI — BIBLIOGRAFIA.

VI.—BIBLIOGRAFIA.

(1).— Información de los laboratorios Warner Chilcott:

Desikachar, N. 1931. Studies in enzyme action. Part. IV. The nature of Stability of papain. *Ind. Eng. Chem.* 32: 1227.

Mc. Millan, H. F. 1915. Papain. *Chemist and Druggist* 86: 133.

Ganapathy, C. V. & S. R. Hoover. 1937. The milk clotting activity of papain. *J. Biol. Chem.* 130: 699.

Darby, H.H. 1941. Papain. *J. Biol. Chem.* 139: 721.

Bergmann, M. L. Zervas, & J. S. Fruton, 1936. On proteolytic enzymes. XI. The specificity of the enzyme papain peptidase. *J. Biol. Chem.* 115: 593.

Gore, H. C. 1929. Action of papain on the polarization of gelatin. A new method of measuring proteolytic activity. *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.* 1: 203.

Lemor, F. C. 1943. The gelatin viscosity reduction method of measuring proteolytic activity. *J. Council Sci. Ind. Research* 16: 155.

Wittmack, C. 1878. The fermentative action of papaya juice of

the fruit of *Carica papaya*. *Pharm J.* 9: 449.

Giri, K.V. & Seshagiraras 1942 On the nature of the active group in papain. *Science and Culture* 18:140

Scott, E. M. & W.M. Sandstrom 1942. The activation of papain. *Arch Biochem* 1:103

- (2).— Tesis Coronado M. Magrialea. Estudio y obtención de papaina.
- (3) — Vitoria E. S. J. La catalisis quimica. Cuarta Edición. Editorial "Tip Cat Casals", Barcelona 1946
- (3).— Eldbacher S. Trad. E. Benarte Casanova. Compendio de quimica Fisiológica. Espasa Calpe, S. A. Madrid 1943
- (5).— Methods of Analysis of the Association of official Agricultural Chemist. 9ª Edición. Editorial Board 1960