

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

“Acción de la enzima bromelina en la disgregación de hematomas y
disminución de la inflamación”

María José Chinchilla Reyes

Química Farmacéutica

Guatemala, febrero de 2014

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

“Acción de la enzima bromelina en la disgregación de hematomas y
disminución de la inflamación”

Informe de Tesis

Presentado por

María José Chinchilla Reyes

Para optar el título de

Química Farmacéutica

Guatemala, febrero de 2014

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Manuel Cobar Pinto, Ph. D.

Decano

Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.

Secretario

Licda. Liliana Vides de Urizar

Vocal I

Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares

Vocal II

Lic. Rodrigo José Vargas Rosales

Vocal III

Br. Lourdes Virginia Nuñez Portales

Vocal IV

Br. Julio Alberto Ramos Paz

Vocal V

AGRADECIMIENTOS

- A Dios y a la Virgen María por la bendición que me han dado al poder obtener este logro.
- A La Universidad de San Carlos de Guatemala
- A La Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia
- A MI ASESOR Lic. Julio Chinchilla por su apoyo incondicional en la elaboración de este trabajo de investigación, sus consejos y su paciencia pero sobre todo por su valiosa amistad.
- A MI REVISOR Lic. Estuardo Serrano por su apoyo incondicional, su colaboración en la investigación y por su valiosa amistad.
- A La Licenciada Julia García y Aylin Santizo por su apoyo y su cariño.
- A Mis amigas con las que compartí más de 5 años de penas, alegrías, desvelos María Fernanda Filippi, Gabriela de León y Gabriela Higueros.
- A Todas las personas que colaboraron en la fase experimental de la investigación, agradezco su confianza

ACTO QUE DEDICO

A DIOS

Por las bendiciones que ha derramado en mi vida, porque me dio la fuerza en los momentos difíciles y la sabiduría para culminar mi carrera, sin su amor esto no sería posible. Le estoy eternamente agradecida.

A MI MADRE SANTÍSIMA

Por su intercesión, por ser fuente de sabiduría, por mandar siempre a sus ángeles a ayudarme, por su amor de madre.

A MI PAPÁ

Por apoyarme siempre, por ser un ejemplo de esfuerzo y superación. Gracias por tu esfuerzo porque sé que todo tu trabajo ha sido por nosotras.

A MI MAMÁ

Por ser mi guía en la vida, por apoyarme siempre con sus sabías palabras, por ser un ejemplo de fe y alegría. Gracias por ser mi maestra en la vida, gracias a tus correcciones, amor y oraciones soy lo que soy.

A MI HERMANA

Por ser mi amiga y mi apoyo incondicional, sobre todo en mis desvelos y cuando ya no podía más.

A MIS ABUELITOS

Oscar, Neftalí (Q.E.P.D), Gloria y Emilia, por preocuparse siempre por mí, por siempre estar pendiente, por su cariño y sus detalles. En especial a mi abuelita Gloria porque siempre estuvo pendiente de mi almuerzo.

A MI TIA LOURDES Y FER

Por apoyarme, porque siempre se preocuparon por mí, por su cariño. Por compartir conmigo mis alegrías y mis tristezas.

A MIS TÍOS

Vinicio (Q.E.P.D.), Irving y Enio, Por el apoyo y cariño que siempre me han brindado. En especial a mi tío Enio por compartir conmigo las bendiciones que Dios le ha dado.

A MIS PRIMAS

Porque son mis hermanas, porque hemos compartido momentos inolvidables juntas, por siempre traer alegría a mi vida.

A MIS PRIMOS

Porque son mis hermanos y a su forma pero me han demostrado su cariño y preocupación por mí.

A VERÓNICA Y YANIRA

Por su cariño y sus muestras de apoyo siempre.

A DENSYL

Por su amor y apoyo incondicional, por entenderme y tenerme paciencia en todo momento.

Índice

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| 1. Resumen..... | 1 |
| 2. Introducción | 2 |
| 3. Antecedentes | 3 |
| 3.1.Características de la piña | 3 |
| 3.2.Enzimas proteolíticas | 4 |
| 3.2.1. Bromelina | 4 |
| 3.3.Fisiología de la piel | 7 |
| 3.4.Absorción percutánea | 8 |
| 3.5.Sistemas Transdérmicos | 9 |
| 3.6.Inflamación | 10 |
| 3.6.1. Fases de la inflamación | 11 |
| 3.7.Hematomas | 17 |
| 4. Justificación | 19 |
| 5. Objetivos..... | 20 |
| 6. Hipótesis..... | 21 |
| 7. Materiales y Métodos | 22 |
| 8. Resultados..... | 28 |
| 9. Discusión | 34 |
| 10. Conclusiones | 38 |
| 11. Recomendaciones..... | 39 |
| 12. Referencias..... | 40 |
| 13. Anexos..... | 43 |

1. Resumen

La bromelina es una enzima presente en la piña la cual presenta acción proteolítica y que por sus propiedades es utilizada como antiinflamatoria, fibrinolítica, antitrombótica entre otros usos. Se realizó un estudio en el que se pretendía determinar la acción de la bromelina en la disgregación de hematomas y la disminución de la inflamación.

Se realizó la extracción de la enzima a partir de troncos de piña ya que es en donde la enzima se encuentra en mayor cantidad, esta parte de la planta es la que se descarta luego del corte de la fruta. La extracción se realizó con etanol al 95%, se centrifugó y se dejó evaporar el solvente para obtener la enzima bromelina. El porcentaje de rendimiento de la extracción fue de 0.594% el cual es muy bajo y no se logró utilizar el extracto obtenido de los troncos de piña y se utilizó bromelina comercial.

Se realizó la preparación de un gel al cual se le incorporó bromelina comercial obtenido un preparado farmacéutico de acción tópica. Antes de ser utilizado por los pacientes se realizaron pruebas microbiológicas las cuales denotaron la ausencia de microorganismos patógenos y contaminantes.

Para establecer el comportamiento de la enzima con el tiempo se realizó un estudio de estabilidad, inicialmente a diferentes temperaturas a 25°C, 35°C y 4°C, a las temperaturas más altas no fue posible continuar con el estudio ya que el gel presentaba cambios físicos y disminución de la actividad enzimática por lo que se continuó con el estudio de estabilidad a 4°C obteniendo un aumento en la actividad enzimática del gel, disminución del pH y manteniendo el color original.

Para la medición enzimática se realizó una curva de calibración con bromelina a diferentes concentraciones y observando la acción proteolítica de la enzima debido a la precipitación de la caseína que es una proteína presente en la leche.

Por último se realizó un estudio clínico fase I, en donde se aplicó el gel con extracto de bromelina a 13 pacientes que cumplieran con los criterios de inclusión, posteriormente de la aplicación del preparado todos indicaron que el gel había ayudado a la disgregación de hematomas medido en relación del tiempo en el que se desaparecen los hematomas según cada persona. También se estableció la actividad antiinflamatoria del gel con extracto de bromelina, en donde 10 pacientes indicaron que disminuyó la inflamación.

2. Introducción

La piña es una fruta tropical cosechada en Guatemala, este fruto es rico en diferentes nutrientes, contiene en su pulpa enzimas que disuelven las proteínas y que reciben el nombre genérico de bromelaína o bromelina. Si bien toda la pulpa de la piña la contiene, la bromelaína se concentra más en el troncho central de la piña que es precisamente la parte que se desecha. (Berdonces, J. 2008).

La bromelina es una enzima de acción proteolítica, es decir, capaz de “romper” las moléculas de las proteínas dejando libres los aminoácidos que las forman, en cuanto al campo clínico tienen potencialidades como antiedematosas, antiinflamatorias, antitrombóticas y fibrinolíticas.

Debido a que la piña es una fruta de gran consumo en nuestro país, se utilizó el tallo, parte que no es utilizada en alimentación, para realizar la extracción de la enzima bromelina, teniendo en cuenta las posibles aplicaciones clínicas de esta enzima se quiere comprobar su acción en la disgregación de hematomas y disminución de la inflamación.

Dicha enzima ya ha sido utilizada en la industria farmacéutica como un favorecedor en el proceso digestivo pero no para el uso planteado en la presente investigación ni en la forma farmacéutica establecida.

Para la comprobación de la acción de esta enzima se aplicó en una población que presentaba frecuentemente hematomas es por esto que se realizó un estudio clínico fase I en el cual se aplicó el preparado farmacéutico con el extracto de la enzima y se evaluó descriptivamente la acción de esta en una muestra de pacientes que realizan deporte constantemente y sufren lesiones o están expuestos a golpes.

3. Antecedentes

3.1 Características de la Piña

- Sinonimia científica: *Ananas sativus*
- Sinonimia hispánica: Piña tropical, piña americana
- Descripción: Fruto compuesto, formado por la unión de los frutos de varias flores alrededor de un eje carnoso. Planta herbácea de la familia de las Bromeliáceas que alcanza hasta 50 cm de altura.
- Hábitat: Se cultiva en regiones tropicales de América, Asia y Oceanía. Las islas Hawai, Tailandia y Brasil son los principales productores (Pamplona R., 2002)

La piña tropical contiene en su pulpa unas enzimas que disuelven las proteínas y que reciben el nombre genérico de bromelaína. La bromelaina tiene una actividad fibrinolítica, esto es, que disuelve los pequeños trombos de fibrina. Por su capacidad de disolver ciertas proteínas, la piña tropical es un excelente postre después de una comida excesivamente rica en proteínas. Si bien toda la pulpa de la piña la contiene, la bromelaína se concentra más en el tronco central de la piña que es precisamente la parte que se desecha. (Berdonces, J. 2008)

La piña es una fruta tropical de la familia de las bromeliaceae, es rica en vitaminas A,B,C y tiene actividad proteolítica debida a la bromelina que se activa por la cisteína, tiosulfato y glutatión. Es inhibida o inactivada por iones metálicos oxidantes y por agentes que reaccionan con los tioles (ácido ascórbico). La bromelina de los frutos es una proteasa ácida, su intensa actividad proteolítica no se modifica en zonas de pH entre 3 y 8. Es una proteína constituida por aminoácidos que se encuentran enrollados en dos partes separadas por un puente que tiene un lugar activo con un grupo tiol (SH) libre (Gallardo, et.al. , 2009).

3.2.Enzimas proteolíticas

Las proteasas son enzimas que hidrolizan las cadenas polipeptídicas de las proteínas sustrato, se caracterizan por tener gran variedad de especificidades. De acuerdo con el aminoácido o metal que posean en su sitio activo se clasifican en cuatro familias: serina proteasas, asparticoproteasas, cisteína proteasas y metaloproteasas (Carrera, 2003).

3.2.1. Bromelina

Se trata de una enzima o fermento de acción proteolítica, es decir, capaz de “romper” las moléculas de las proteínas dejando libres los aminoácidos que las forman. Actúa en el tracto digestivo deshaciendo las proteínas y facilitando la digestión. (Pamplona R., 2002)

Se obtiene del jugo, de la fruta o de los tallos de la piña (*Ananas comosus*). Es una glicoproteína del grupo de las cisteín proteasas. Actúa de preferencia sobre los aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas. Su pH óptimo varía con el sustrato, en el rango de 5 a 8. Tiene baja tolerancia térmica. La enzima se utiliza principalmente como ablandador de carne (tiene buena actividad sobre los tendones y el tejido conectivo rico en elastina) y para hidrolizar proteínas solubles de la cerveza que pudieran precipitar y causar opacidad por el enfriamiento (Carrera, 2003).

Se ha descrito que muestra varias acciones farmacológicas por ejemplo aumenta la absorción de medicamentos. Se ha utilizado en tratamientos de desórdenes digestivos, en enfermedades virales y en la formulación de vacunas. Tienen potencialidades como antiedematosa, antiinflamatoria, antitrombótica y fibrinolítica. Recientemente, se demostró la posible actividad antitumoral de cisteíno-proteasas como la bromelina contenida en la piña en 5 tumores transplantables de ratón, así como la inhibición en la proliferación de tumores cerebrales (Gallardo, et.al. , 2009).

En estudios realizados en Alemania, especialmente por los doctores Steven J. Taussig y Hans A. Nieper, se demostró que la bromelaína tomada por vía oral reduce la placa de ateroma, disminuye la agregación de las plaquetas y disuelve los trombos de fibrina (Berdonces, J. 2008).

Propiedades Químicas

Yasuda, Takanashi y Murashi en 1970, reportaron la estructura y composición de la bromelina. (Pulido, 2007)

El principal residuo amínico terminal, es la valina y el carboxilo terminal es glicina (Pulido, 2007)

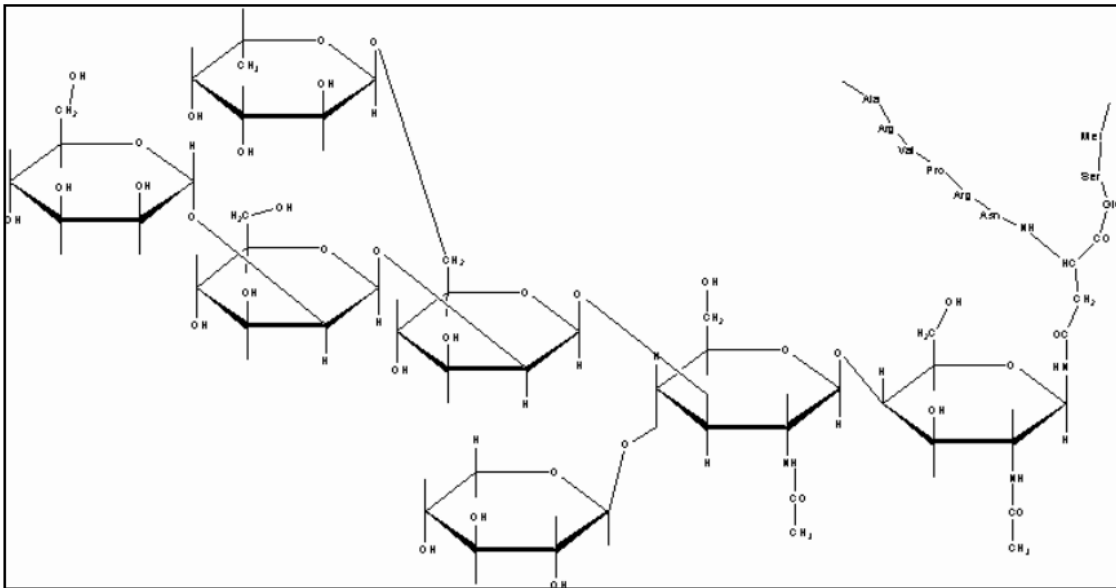
La enzima es una glicoproteína que tiene un oligosacárido por molécula, el cual está único por covalencia a la cadena peptídica. (Pulido, 2007)

La bromelina del tallo tiene un grupo sulfhidrilo reactivo por molécula, el cual es esencial para la catálisis enzimática. (Pulido, 2007)

Los principales aminoácidos contenidos en la Bromelina son:

| | |
|-----------------|-----------------|
| Arginina | Valina |
| Arg | Val |
| Acido Aspartico | Glicina |
| Asn | Gly |
| Serina | Metionina |
| Ser | Met |
| Prolina | Amonio |
| Pro | NH ₄ |
| Alanina | Glucosamina |
| Ala | Glu |

Figura No. 1: Estructura de la enzima Bromelina



Fuente: Pulido, 2007

Tabla No. 1 Propiedades físicas de la bromelina

| Origen | Tallo de Piña |
|--------------------------------------|----------------|
| Peso molecular | 33000 Da |
| Color | Blanco |
| Estado | Polvo |
| Olor y sabor | Característico |
| Solubilidad | En agua |
| pH óptimo | 7 |
| Actividad enzimática | 1200 GDU/gr |
| Temperatura de inactivación | 70°C |
| Temperatura de almacenamiento | 25°C |

Fuente: Pulido, 2007

Probablemente es la primera enzima proteolítica de origen de plantas que ha sido establecida como una glicoproteína. (Budawari, 1996)

3.3.Fisiología de la piel

Existen diferentes estructuras que actúan como barrera para la penetración de drogas: la capa epicutánea (un manto ácido y una capa acuosa), la capa electrolítica subcórnea, la epidermis, la unión dermoepidérmica, la dermis y la unidad pilosebácea (Allevato, 2007).

Las drogas pueden atravesar la piel por diferentes rutas: intracelular, transcelular, transfolicular, vía glándula sebácea, vía glándula sudorípara y mixta, siendo la vía intercelular lo más común (Allevato, 2007).

En cualquier superficie cutánea la penetración cumple la ley de Fick que establece que el flujo es inversamente proporcional al espesor. Al respecto es útil conocer las zonas de piel donde el estrato córneo es sumamente delgado. La piel del escroto es muy fina y casi tan permeable como la mucosa oral. En la cara y el cuero cabelludo la permeabilidad también es elevada, debido a defectos en la estructura de la capa córnea y a la abundancia de folículos que actúan como agujeros de baja resistencia; en la cara la penetración es hasta 10 veces superior que en el torax (Allevato, 2007).

En términos generales se reconoce que las personas de origen celta, piel blanca y ojos azules tienen una capa córnea más delgada, en contraste con las personas de piel oscura cuyo estrato córneo tiene un mayor número de capas celulares y es más denso lo cual le confiere resistencia al intercambio químico (Allevato, 2007).

Las glándulas sebáceas son más permeables que los corneocitos, por lo tanto la unidad pilosebácea (folículo piloso, pelo y glándula sebácea constituye una vía alternativa que permite que las drogas alcancen la dermis invadiendo la impermeabilidad relativa del estrato córneo intacto (Allevato, 2007).

Para aumentar la difusión a través de la piel se han ensayado técnicas de modificación de la estructura del estrato córneo, mediante remoción de lípidos aplicando solventes orgánicos o remoción de corneocitos y lípidos, pero no son

métodos efectivos dada la elevada tasa de recambio de esa capa cutánea. La mejor estrategia es la hidratación la que incrementa el espesor vertical de la capa celular reduciendo su densidad y disminuyendo la resistencia a la difusión (Allevato, 2007).

Los sistemas transdermicos son oclusivos y como tales potencian la hidratación al reducir la evaporación de agua, además aumentan la temperatura de la piel a valores cercanos a la central (37°) lo cual agrega un refuerzo termodinámico a la difusión (Allevato, 2007).

3.4. Absorción percutánea

La penetración de un principio activo hasta la circulación sistémica o los tejidos circundantes involucra multiples procesos: disolución y liberación dentro y desde la formulación, partición dentro del estrato córneo, difusión a través del estrato córneo, partición desde el estrato córneo hacia la fase acuosa de la epidermis, difusión a través de la dermis y acceso a la circulación sistémica y/o tejidos circundantes (Allevato, 2007).

En forma general, la capacidad de las drogas de difundir a través de las membranas biológicas depende de su peso molecular (<400), del tamaño molecular, del grado de ionización solubilidad; el equilibrio entre la liposolubilidad e hidrosolubilidad; grado de ionización (Allevato, 2007).

El estrato córneo funciona como una barrera altamente lipofílica, la cual evita la pérdida excesiva de agua y previene la penetración de moléculas. Los corneocitos queratinizados conforman una barrera que dificulta el pasaje de moléculas, independientemente de su tipo. Asimismo, los lípidos hidrofóbicos intercelulares lo hacen impermeables a las sustancias hidrofílicas (Allevato, 2007).

Se ha planteado que el éxito de todo sistema terapéutica transdérmico (STT) depende de la capacidad de la sustancia de difundirse a través de la piel en cantidades suficientes para lograr el efecto terapéutico deseado (Tabla No. 1) (Allevato, 2007).

Todos los sistemas de este tipo, que se encuentran actualmente en el mercado, contienen principios activos con un coeficiente de difusión dependiente de la naturaleza del polímero y del tamaño molecular del principio activo. Estos sistemas obtienen niveles constantes y bajos de sustancia activa en plasma para lograr su efectividad terapéutica (Allevato, 2007).

En los sistemas transdérmicos, una vez que el principio activo se ha liberado al medio ambiente, la penetración del fármaco por la piel se realiza a través de una serie de pasos de difusión y de transporte activo (Allevato, 2007).

Tabla No.2: Capacidad de penetración transdérmica.

| Grado de penetración | Características |
|----------------------|--|
| Pobre | Polímeros de alto peso molecular y macromoléculas (proteínas y polisacáridos). |
| Pobre | Electrolitos solubles en agua (sodio, cloro). |
| Pobre | Sustancias solubles en agua (glucosa, urea). |
| Buena | Sustancias lipo e hidrosolubles. |
| Excelente | Sustancias liposolubles, no polares, bajo peso molecular. |

Fuente: (Allevato, 2007)

3.5.Sistemas Transdermicos

Existen dos tipos de transporte de medicamento a través de la piel

- El transporte pasivo y el transporte activo.

El transporte pasivo de medicamentos a través de la piel se efectúa mediante una difusión por los tortuosos espacios intercelulares y en función de un gradiente de concentración (Allevato, 2007)

Los fármacos penetran por difusión pasiva, dependiendo de la interacción entre el fármaco, la piel y los excipientes. La piel tiene una función de barrera representada estructuralmente por la dinámica de la capa córnea; las propiedades fisicoquímicas del fármaco (principio activo + excipientes); la estructura y

composición del estrato córneo son los principales parámetros capaces de modificar la difusión y la penetración (Allevato, 2007)

El paso limitante de la absorción percutánea es la transferencia del principio activo desde la superficie cutánea a través del estrato córneo. Este proceso ocurre bajo la influencia de un gradiente de concentración y su consecuente difusión por todas las capas de la piel hasta llegar a la microcirculación. La penetración molecular a través de las diferentes regiones de la piel está limitada por la resistencia difusional que ofrecen estas capas y la posición que ofrece la microvasculatura a la liberación sistémica del principio activo (Allevato, 2007).

3.6.Inflamación

La inflamación es la respuesta, del sistema inmunológico de un organismo, al daño causado a sus células y tejidos vascularizados por patógenos bacterianos y por cualquier otro agresor de naturaleza biológica, química, física o mecánica. Aunque dolorosa, la inflamación es, normalmente, una respuesta reparadora; un proceso que implica un enorme gasto de energía metabólica. (Bordes, et.al., 2000)

Clásicamente la inflamación se ha considerado integrada por los cuatro signos de Celso: Calor, Rubor, Tumor y Dolor. El calor y rubor se deben a las alteraciones vasculares que determinan una acumulación sanguínea en el foco. El tumor se produce por el edema y acúmulo de células inmunes, mientras que el dolor es producido por la actuación de determinados mediadores sobre las terminaciones nerviosas del dolor. (Bordes, et.al., 2000)

3.6.1. Fases de la inflamación

- a. Liberación de mediadores. Son moléculas, la mayor parte de ellas, de estructura elemental que son liberadas o sintetizadas por el mastocito bajo la actuación de determinados estímulos.
- b. Efecto de los mediadores. Una vez liberadas, estas moléculas producen alteraciones vasculares y efectos quimiotácticos que favorecen la llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio.
- c. Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio. Proceden en su mayor parte de la sangre, pero también de las zonas circundantes al foco.
- d. Regulación del proceso inflamatorio. Como la mayor parte de las respuestas inmunes, el fenómeno inflamatorio también integra una serie de mecanismos inhibidores tendentes a finalizar o equilibrar el proceso.
- e. Reparación. Fase constituida por fenómenos que van a determinar la reparación total o parcial de los tejidos dañados por el agente agresor o por la propia respuesta inflamatoria. (Bordes, et.al., 2000)

a. Liberación de mediadores. El mastocito

Aunque todos los tejidos al lesionarse van a liberar mediadores de la inflamación, la fuente principal de los mismos es el mastocito. Esta es una célula inmune inespecífica que también procede de la médula ósea, aunque los mecanismos de su diferenciación no son bien conocidos. El mastocito contiene en el citoplasma gránulos con mediadores de la inflamación preformados. Cuando se activa, libera estos factores, junto con otros de carácter lipídico que son sintetizados de novo. El mastocito se detecta en casi todos los tejidos, siendo localizado principalmente alrededor de los pequeños vasos, sobre los que actuarán los mediadores una vez liberados. (Bordes, et.al., 2000)

La liberación de mediadores ocurre por distintas causas, pero quizás la más frecuente sea la lesión directa de la célula por el agente agresivo. Cuando la inflamación progresa y se acumulan en el foco suficientes factores activados del complemento, el C3a y el C5a, actuando sobre receptores de membrana, inducen la activación del mastocito y la consiguiente liberación de mediadores. Otro mecanismo de activación se desarrolla mediante la IgE que es captada en la membrana del mastocito, ya que éste presenta receptores para la porción Fc de esta inmunoglobulina (FceR). El antígeno activa al mastocito cuando conecta específicamente con dos IgE contiguas sobre la membrana (Bordes, et.al., 2000)

Los mecanismos bioquímicos que subyacen a este proceso no son aún bien conocidos. Parece que el proceso se inicia en la membrana con activación de adenilato-ciclasa y de fosfolipasa A2. La adenilato-ciclasa determina un incremento inicial de la concentración intracitoplasmática de cAMP, mientras que la fosfolipasa ataca a los lípidos de membrana produciendo ácido araquidónico. También aumenta la permeabilidad de membrana al Ca⁺⁺, con lo que se incrementa la concentración de este ión en el citoplasma. El aumento de la concentración de Ca⁺⁺ y el del cAMP determinan la formación de microtúbulos en el mastocito, así como el movimiento de gránulos citoplasmáticos hacia la membrana celular, produciéndose posteriormente la fusión de los gránulos con ésta y la liberación de mediadores al espacio extracelular. Estos mediadores, que se encontraban preformados en los gránulos, son principalmente histamina, enzimas proteolíticas, el factor quimiotáctico del eosinófilo (ECF-A, eosinophil chemotactic factor), factor quimiotáctico del neutrófilo (NCF, neutrophil chemotactic factor) y heparina. (Bordes, et.al., 2000)

El ácido araquidónico formado puede seguir dos vías metabólicas, la de la enzima ciclo-oxigenasa que determina la producción de

prostaglandinas (PG) y tromboxanos y la de la lipooxigenasa que conduce a la formación de leucotrienos (LT). Todas estas sustancias de carácter lipídico, sintetizadas de novo por el mastocito, son un segundo grupo importante de mediadores de la inflamación. (Bordes, et.al., 2000)

El basófilo es una célula preponderantemente sanguínea, acude a los tejidos durante el proceso inflamatorio y supone un refuerzo en la liberación de mediadores ya que se activa por los mismos mecanismos que el mastocito y libera mediadores equivalentes a los de esta célula. (Bordes, et.al., 2000)

b. Efectos de los mediadores

▪ Mediadores preformados

1. Histamina.

Es un mediador ampliamente distribuido por el organismo aunque se detecta principalmente en el mastocito y basófilo. Deriva, por descarboxilación, del aminoácido histidina. Actuando sobre los receptores H1 (histamina 1) de los vasos produce vasodilatación e incremento de la permeabilidad. Cuando la histamina actúa sobre receptores H2 (histamina 2) produce efectos inhibidores o reguladores de la inflamación.

2. Enzimas proteolíticas.

De las distintas enzimas proteolíticas liberadas por el mastocito, quizás la más interesante sea la kininogenasa que actúa sobre las proteínas procedentes de la sangre y denominadas kininógenos, produciendo su ruptura en péptidos más pequeños denominados kininas. Las kininas inducen vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular y estimulan las terminaciones nerviosas del dolor.

3. Factores quimiotáticos.

El ECF-A incluye dos tetrapéptidos de alrededor 500 d. de peso molecular que atraen eosinófilos al foco inflamatorio, induciendo simultáneamente la activación de estas células. El NCF es una proteína de un peso molecular superior a 750.000 d. con capacidad de atraer y activar al neutrófilo.

4. Heparina.

Al inhibir la coagulación, favorece la llegada al foco inflamatorio desde la sangre de moléculas y células. (Bordes, et.al., 2000)

▪ **Mediadores sintetizados de novo**

1. PGE2

Es la prostaglandina más importante en el proceso inflamatorio. Produce vasodilatación y dolor. En coordinación con el factor C5a y LTB4 aumenta la permeabilidad vascular. El efecto antiinflamatorio de la aspirina se debe a que al bloquear la vía de la ciclo-oxigenasa impide la formación de esta prostaglandina.

2. LTB4.

Es un factor quimiotático para eosinófilos, neutrófilos, mastocitos y macrófagos.

3. Factor activador de plaquetas (PAF: Platelets Activating Factor).

Este factor tiene varias propiedades. Activa las plaquetas determinando su agregación, con la liberación de mediadores por parte de estos cuerpos e inicio de los procesos de coagulación. Produce además, vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular. Es, por otra parte, un potente factor quimiotático y activador de neutrófilos. (Bordes, et.al., 2000)

c. Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio

Desde el punto de vista cronológico, los mediadores de la inflamación van a producir básicamente dos efectos. En una primera fase, alteraciones vasculares que facilitan el trasvase de moléculas desde la sangre al foco inflamatorio, así como la producción de edema. En una segunda fase, más tardía, las propias alteraciones vasculares, así como la liberación en el foco de factores quimiotácticos, determinan la llegada de células inmunes procedentes de la sangre y de los tejidos circundantes (Bordes, et.al., 2000).

d. Regulación de la respuesta inflamatoria

Como la mayor parte de las respuestas inmunes, el fenómeno inflamatorio se encuentra estrechamente regulado, evitando, así una respuesta exagerada o perjudicial. Algunos de los mediadores que producen activación, al variar su concentración o actuar sobre distintos receptores, van a producir inhibición, consiguiendo, de esta forma, un equilibrio o modulación de la respuesta inflamatoria. Los siguientes factores intervienen en esta regulación: (Bordes, et.al., 2000)

1. Histamina.

Actuando sobre receptores H₂, induce en el mastocito y basófilo una inhibición de la liberación de mediadores, inhibe la actividad del neutrófilo, inhibe la quimiotaxis y activa las células T supresoras.

2. PGE.

Produce en el mastocito y basófilo una inhibición de la liberación de mediadores y sobre los linfocitos una inhibición de la proliferación y diferenciación.

3. Agonistas autonómicos.

El mastocito y basófilo parecen presentar receptores α y β -adrenérgicos y ζ -colinérgicos que sugieren que la liberación de mediadores podría estar sometida a una regulación autonómica. La activación del receptor β -adrenérgico produce una inhibición, mientras que la activación del α -adrenérgico y ζ -colinérgico inducen la estimulación

4. Heparina.

Inhibe la coagulación y la activación de los factores del complemento.

5. Eosinófilo.

Esta célula, atraída por el ECF-A, acude al foco inflamatorio donde libera una serie de enzimas que degradan determinados mediadores potenciadores de la inflamación. La histaminasa actúa sobre la histamina, la arilsulfatasa sobre los leucotrienos y la fosfolipasa sobre el PAF. (Bordes, et.al., 2000)

e. Reparación

Cuando las causas de la agresión han desaparecido o han sido eliminadas por la propia respuesta inflamatoria, se inician los procesos de reparación. Estos procesos integran la llegada a la zona de fibroblastos que van a proliferar y sintetizar colágeno, proliferación de células epiteliales y proliferación de vasos dentro de la herida.

No se conocen bien los mediadores responsables de estos fenómenos, parece ser que la IL-1 es la responsable de la activación de los fibroblastos. (Bordes, et.al., 2000)

3.7.Hematomas

Las agresiones que puede sufrir nuestro cuerpo son variadísimas, pero muchas de ellas pueden encuadrarse dentro de la siguiente descripción de carácter general: un agente externo que actúa de una manera brusca sobre una zona determinada del cuerpo, logrando superar la resistencia de los tejidos sobre los que actúa. Tras la actuación de dicho agente, queda un daño en nuestro cuerpo; a eso lo llamamos traumatismo. Así pues, los traumatismos no son los accidentes, los golpes sino el efecto producido por un agente externo que actúa de una manera brusca sobre una zona determinada del cuerpo logrando superar la resistencia de los tejidos sobre los que actúa (García, 2000).

Los traumatismos se clasifican en función de la naturaleza del agente que los produce. Así hablamos de traumatismos mecánicos cuando el agente causal es una energía mecánica; cuando el agente es una sustancia que reacciona con nuestros tejidos, hablamos de traumatismos químicos, y cuando se trata de algún otro tipo de energía entonces nos referimos al traumatismo como producido por agentes físicos (García, 2000).

Se puede hablar de traumatismos mecánicos cerrados y traumatismos mecánicos abiertos. Un traumatismo mecánico cerrado es el efecto producido por una fuerza que actúa desde el exterior, de una manera brusca, sobre una zona determinada del cuerpo, logrando superar la resistencia de los tejidos sobre los que actúa, pero respetando la continuidad del epitelio de revestimiento. Esto se puede denominar contusión (García, 2000).

Las contusiones de primer grado suelen ser lesiones muy localizadas, y se caracterizan por presentar un daño mínimo, concretado principalmente en la rotura de vasos sanguíneos de muy pequeño calibre o capilares. Estas roturas se traducen en manchas en la piel. En unos casos vemos un punteado hemorrágico lo que se conoce como petequias. En otros casos, esas manchas son tan numerosas que forman un continuo, una mancha de cierto tamaño, pero siempre plana y se

denominan equimosis o sugilaciones (lo que en lenguaje coloquial llamamos moretones o cardenales (García, 2000).

Reservamos la calificación de segundo grado para aquellas contusiones en las que, debido a la rotura de vasos de mayor calibre, se produce un acúmulo importante de líquido ocupando un espacio o incrementando el volumen de la zona. Cuando la rotura afecta a vasos sanguíneos se produce un acúmulo de sangre extravasada, lo que recibe el nombre de hematoma. Dependiendo de la naturaleza del tejido en que acontece, la sangre puede disecar un nuevo espacio, formando una especie de cisterna o colección líquida, y lo llamamos hematoma circunscrito (García, 2000).

En tejidos más laxos la sangre difunde por el espacio intersticial sin ocupar un espacio propio; en estos casos hablamos de hematomas difusos. Posteriormente la sangre se degradará y terminará por reabsorberse, no quedando rastro del hematoma. Sin embargo, en algunos casos se produce una reacción fibrosa encaminada a aislar el hematoma, ya que la sangre fuera de los vasos resulta irritante para los tejidos (García, 2000).

De esta manera se forma una envoltura conectiva que delimita al hematoma e impide su reabsorción; hablamos entonces de un hematoma encapsulado. Transcurrido un cierto tiempo la fibrina se desnaturaliza, pierde su polimerización y nos encontramos con una cápsula conectiva englobando un líquido y se habla entonces de un hematoma enquistado. Estos hematomas, en algunas circunstancias pueden experimentar el depósito de sales cálcicas y adquieren consistencia pétreas: hematoma calcificado (García, 2000)

A medida que sanan los moretones (contusiones), generalmente en 2 a 4 semanas, frecuentemente cambian de color, entre ellos negro violáceo, azul rojizo o verde amarillento. Algunas veces la zona del moretón se extiende hacia abajo en dirección de la gravedad. Por lo general, un moretón en una pierna tardará más tiempo en sanar que uno en la cara o los brazos (Blaht, 2011).

4. Justificación

La piña es una fruta con un alto valor nutricional presentando también utilidad en el ámbito de la medicina natural específicamente por sus propiedades digestivas, posee una enzima llamada bromelina que es una enzima proteolítica y cuando es ingerida ayuda a la disolución de las proteínas de una comida en el tracto gastrointestinal. Teniendo conocimiento de estas aplicaciones se quiere comprobar si la enzima bromelina tiene acción tópica ayudando a la disgregación de hematomas y disminución de la inflamación proveniente de una lesión en pacientes que realizan deporte para contribuir al inicio de un estudio clínico sobre las propiedades de esta enzima. Por este motivo la presente investigación será un estudio fase I.

Para la comprobación de la acción de la bromelina en la disgregación de hematomas y disminución de la inflamación inicialmente se debe extraer la enzima de la piña utilizando la parte de desecho del cultivo de la misma y darle así un uso terapéutico considerando la presencia de la enzima en una concentración elevada. Se deberá comprobar la acción proteolítica del extracto por medición de la precipitación de la caseína que es una proteína presente en la leche. Posteriormente se realizará la fabricación de un preparado farmacéutico conteniendo el extracto de bromelina que tenga las propiedades de penetrabilidad necesarias para poder tener el efecto esperado. El preparado se deberá aplicar a la muestra seleccionada y se analizará descriptivamente por medio de un cuestionario que será contestado por los participantes del estudio para comprobar la acción proteolítica de la bromelina en la disgregación de hematomas y disminución de la inflamación.

5. Objetivos

5.1.Objetivo General

- 5.1.1. Comprobar la efectividad de un producto farmacéutico elaborado a base de bromelina de disgregar los hematomas y disminuir la inflamación

5.2.Objetivos Específicos

- 5.2.1. Obtener bromelina del tallo de la piña por medio de un método de extracción
- 5.2.2. Comprobar la acción proteolítica de la enzima bromelina mediante la disgregación de la caseína y establecer en base a la concentración de la enzima su actividad proteolítica.
- 5.2.3. Diseñar un producto farmacéutico de aplicación tópica que contenga el extracto de bromelina.
- 5.2.4. Realizar pruebas microbiológicas y físicas del producto elaborado
- 5.2.5. Determinar la estabilidad y actividad enzimática de la forma farmacéutica mediante pruebas de estabilidad acelerada durante 3 meses.
- 5.2.6. Evaluar la acción del preparado farmacéutico en la disgregación de hematomas e inflamación.

6. Hipótesis

La enzima bromelina presente en un preparado farmacéutico tiene la capacidad de disgregar los hematomas y disminuir la inflamación.

7. Materiales y Métodos

a. Universo y Muestra

- Universo: Personas que presenten hematomas
- Muestra: 13 personas que presentan hematomas

b. Materiales

1. Extracción de Bromelina

Materia prima: Piña obtenida de Finca Las Rosas, Santa Elena Barillas, Villa Canales.

Reactivos

- Etanol

Cristalería

- 1 beaker de 250mL
- 2 beaker de 1000mL
- 2 cápsulas de porcelana
- 1 probeta de 1000mL

Equipo

- Extractor de jugos
- Centrifugadora
- Horno

2. Preparación de Gel con extracto de Bromelina

- Componentes
 - Carbopol
 - Trietanolamina
 - Agua
 - Bromelina Comercial
 - Propilparaben

- Cristalería
 - 1 beaker de 1000ml
 - 2 beaker de 250ml
 - 2 beaker de 100ml
 - 2 varillas de agitación
 - 1 probeta de 500ml
 - 1 probeta de 10ml
 - 2 espátulas
 - 1 tamizador
 - Equipo
 - Balanza
 - Agitador Universal
 - Estufa
3. Determinación Enzimática del Gel con extracto de bromelina
- Reactivos
 - Fosfato dibásico de sodio
 - Fosfato monobásico de sodio
 - Bromelina Comercial
 - Leche en polvo
 - Cristalería
 - 1 beaker de 600ml
 - 2 beaker de 250mL
 - 8 beaker de 100ml
 - 2 pipetas volumétricas de 10mL
 - 2 Quitasato
 - 2 varillas de agitación
 - 2 espátulas

- Equipo
 - Termómetros de mercurio
 - Bomba de Vacío
 - Embudo Buchner
 - Estufa
 - Papel filtro

c. Métodos

1. Extracción Bromelina

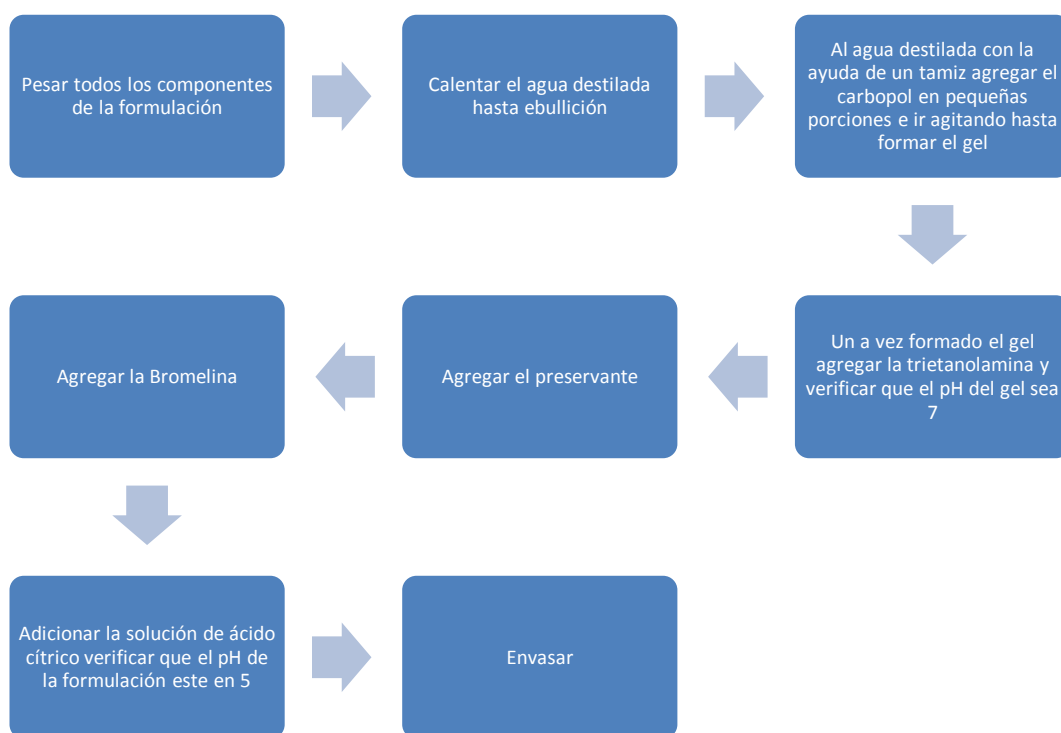
- Moler los trozos del tallo hasta obtener el jugo
- Filtrar el jugo de piña obtenido
- Medir el volumen de jugo con una probeta
- Añadir etanol al 95% al jugo de piña 1.5 veces más del volumen del jugo.
- Almacenar en frasco plástico por 7 días
- Después de 7 días, centrifugar por 20 minutos a 4500rpm
- Eliminar sobrenadante y obtener el precipitado
- Pesar una capsula de porcelana y adicionar la muestra de concentrado de bromelina
- Poner a secar las muestras a 40°C por 48 horas
- Pesar las muestras secas
- Calcular porcentaje de rendimiento

2. Gel a base de Bromelina

2.1. Fórmula Cualitativa

| Componente | Porcentaje | Función |
|---------------------------------|------------|------------------|
| Carbopol | 2.5% | Gelificante |
| Agua | 75% | Vehículo |
| Trietanolamina | 1% | Ajustador de pH |
| Propilparaben | 0.9% | Preservante |
| Bromelina | 16.7% | Principio activo |
| Solución de ácido cítrico al 4% | 4% | Ajustador de pH |

2.2. Procedimiento de manufactura



3. Pruebas microbiológicas

Como parte del control de calidad del gel se realizó una prueba microbiológica ya que según el RTC de “Productos farmacéuticos. Medicamentos para uso humano. Verificación de la calidad” para Cremas, Ungüentos, Pastas y

Geles (tópicos) se requiere un recuento microbiológico por lo que una muestra fue enviada al Laboratorio de Análisis Físicoquímicos y Microbiológicos-LAFYM- para su análisis.

4. Pruebas de Actividad Enzimática del Gel con extracto de Bromelina

- Determinación de la actividad enzimática del gel con extracto de bromelina

- Pesar 1g de gel.
- Agregar 10 ml de solución buffer de fosfatos pH 7
- Agitar la solución;
- Calentar a 40°C;
- Medir 10 g de leche;
- En un balón de 100 ml disolver los 10 g de leche;
- Agregar 10mL de leche en un beaker;
- Calentar hasta 40°C;
- Encender el horno a 100°C;
- Pesar un papel filtro para filtro *buchner*;
- Colocar el papel filtro en el filtro y armar el equipo de filtración;
- Mezclar la leche caliente y la solución de bromelina con el-buffer;
- Filtrar la solución después de 1 minuto;
- Retirar el papel filtro con el material;
- Introducirlo en el horno, a 140°C;
- Pesar el papel filtro.
- Calcular la actividad enzimática del gel (Alvarado, 2012)

5. Ensayo Clínico Fase 1

Criterios de Inclusión:

- Mayor de 15 años
- Presentar hematomas frecuentemente
- De acuerdo con consentimiento informado (Ver Anexo No.1)

Evaluación descriptiva: Cuestionario (Ver Anexo No. 2)

Análisis Estadístico

1. Extracción de la enzima bromelina
Proceso→ Producto
2. Producto→Evaluación de acción proteolítica (Cuantificación) Unidades Enzimáticas Por conveniencia 10 determinaciones y analizar descriptivamente por medio de estadística descriptiva (promedio, desviación estándar, mediana y rango).
3. Formulación y elaboración del producto farmacéutico: Ensayo y error.
4. Evaluación de la calidad del producto →Parámetros que debe cumplir como penetrabilidad en piel y una prueba microbiológica del gel.
5. Estabilidad → Determinación de actividad enzimática por duplicado cada 15 días por 90 días. Gráfica de dispersión y descripción de los resultados.
6. Evaluación clínica: Ensayo clínico Fase 1. Por conveniencia 13 personas que cumplan con los requisitos o criterios de inclusión. Aplicar el producto y evaluar mediante estadística descriptiva las respuestas (Cuestionario o Ficha).

8. Resultados

La investigación se compuso de varias fases; la extracción de la enzima a partir de los tallos de piña, la medición de la actividad enzimática de la misma, la preparación del gel con extracto comercial de bromelina y finalmente se realizó el estudio de estabilidad para observar el comportamiento de la enzima. Se estableció la ausencia de microorganismos patógenos y contaminantes del gel para garantizar un producto farmacéutico seguro microbiológicamente y posteriormente se realizó el ensayo clínico fase I con pacientes que presentan hematomas.

A continuación se presentan los resultados de la investigación. La tabla No. 1 se indica el porcentaje de rendimiento de la extracción de la enzima bromelina a partir de tallos de piña y la actividad enzimática.

Tabla No. 1: Porcentaje de rendimiento de extracción de bromelina

| Cantidad de tallos de piña utilizados | Mililitros de extracto obtenidos de los tallos de piña | Cantidad de bromelina obtenido de la extracción | Porcentaje de rendimiento | Actividad enzimática de la bromelina |
|--|---|--|----------------------------------|---|
| 30 | 600 | 3.5640g | 0.594% | 976.4558 GDU* |

*GDU: Unidades de disolución de gelatina

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Se determinó la actividad enzimática del gel con extracto de bromelina como se observa en la tabla no. 2, se presenta por conveniencia 10 determinaciones y se analizó por medio de estadística descriptiva obteniendo desviación estándar, promedio, mediana y rango.

Tabla No. 2: Actividad enzimática del gel con extracto de bromelina

| No. | Actividad Enzimática GDU |
|----------------------------|---------------------------------|
| 1 | 1919.29 |
| 2 | 1909.62 |
| 3 | 1928.56 |
| 4 | 1942.40 |
| 5 | 1984.65 |
| 6 | 1916.90 |
| 7 | 1917.83 |
| 8 | 1987.57 |
| 9 | 1972.99 |
| 10 | 1945.30 |
| Desviación Estándar | 29.48 |
| Promedio | 1942.51 |
| Mediana | 1935.48 |
| Rango | 77.95 |

*GDU: Unidades de disolución de gelatina

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Se realizó el estudio de estabilidad del gel con extracto de bromelina a diferentes temperaturas resultados que se observan en la tabla No.3, en la primera columna se describen las temperaturas a las que se realizó el estudio, en la segunda columna se observa el tiempo al cual se realizó la medición de la actividad enzimática, en la tercera columna se encuentra el pH según el tiempo y posteriormente se observa la actividad enzimática en la cuarta columna, el color fue un elemento determinante para el estudio ya que se observó que entre mayor es la temperatura mayor es el cambio de coloración del gel y mayor es la disminución de la actividad enzimática. Es decir que la enzima no es estable a altas temperaturas, la coloración se describe en la quinta columna.

Tabla No. 3: Actividad Enzimática del gel con extracto de Bromelina

| Temperatura | Tiempo | pH | Actividad Enzimática por gramo de gel *GDU | Color |
|---------------|---------|----|--|-------------|
| | 0 | 7 | 1942.51 | Beige |
| 25° | 15 días | 7 | 1152.74 | Café |
| 35° | 15 días | 7 | 642.81 | Café oscuro |
| 35° con ácido | 15 días | 5 | 861.36 | Café |
| 4° | 15 días | 7 | 2026.9 | Beige |

*GDU: Unidades de disolución de gelatina

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

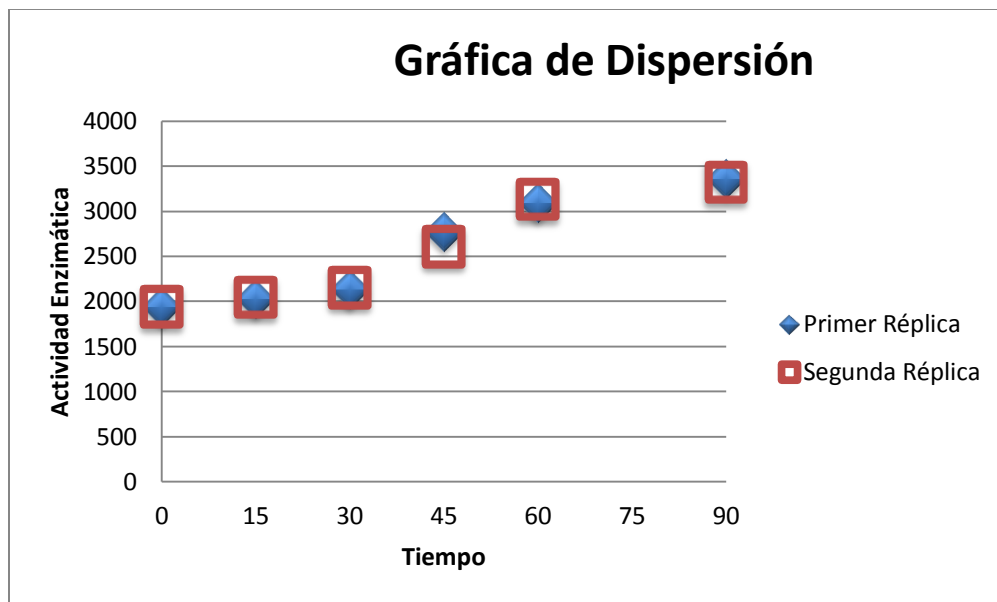
En la tabla No. 4 se puede observar la actividad enzimática del estudio a temperatura de 4°C teniendo una duración de 90 días, se midió cada 15 días y se observó el comportamiento de la enzima, el color del gel y el pH. En la gráfica de dispersión de datos se establece la relación entre el tiempo y la actividad enzimática del gel con dos repeticiones de la misma.

Tabla No. 4: Actividad Enzimática del gel con extracto de Bromelina a 4°C

| Tiempo | pH | Actividad Enzimática por gramo de gel | | Color |
|---------|----|---------------------------------------|---------|-------|
| 0 días | 7 | 1942.51 | | Beige |
| 15 días | 7 | 2026.90 | 2042.14 | Beige |
| 30 días | 5 | 2133.99 | 2152.93 | Beige |
| 45 días | 5 | 2768.50 | 2604.57 | Beige |
| 60 días | 5 | 3087.55 | 3133.24 | Beige |
| 90 días | 5 | 3356.20 | 3324.77 | Beige |

*GDU: Unidades de disolución de gelatina

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Gráfica No. 1: Dispersión de datos de Actividad Enzimática

Fuente: Datos obtenidos tabla No. 4

En la tabla que se presenta a continuación se observan los resultados de los análisis microbiológicos del gel que fue utilizado para la determinación de la acción de la enzima en la disgregación de hematomas según el RTC de “Productos farmacéuticos. Medicamentos para uso humano. Verificación de la calidad” para Cremas, Ungüentos, Pastas y Geles (tópicos) se requiere un recuento microbiológico este recuento fue realizado por el Laboratorio de Análisis Físicoquímicos y Microbiológicos-LAFYM- en donde certifican la ausencia de microorganismos patógenos especificados en la USP 34 para productos no estériles de uso tópico que son *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y el recuento aeróbico total que debe ser de 100 o menor (Anexo No. 5).

Tabla No. 5: Resultados de Análisis Microbiológico

| Análisis | Resultado | Dimensional | USP,34 |
|-------------------------------|------------------|--------------------|---------------|
| Recuento Aeróbico Total | <10UFC/g | UFC/g | ≤ 1000 UFC/g |
| Recuento de Mohos y Levaduras | < 10UFC /g | UFC/g | ≤ 100 UFC/g |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Ausencia | Sin dimensionales | Ausencia |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Ausencia | Sin dimensionales | Ausencia |

UFC/g: Unidades Formadoras de Colonia por gramo.

Fuente: Laboratorio de Análisis Físicoquímicos y Microbiológicos –LAFYM-.

A continuación se presentan los resultados del tiempo en el que se reduce el hematoma utilizando el gel con extracto de bromelina, se asignó un número a cada paciente tal como se observa en la tabla No. 6. Se muestra el tiempo en días en el que desaparece el hematoma utilizando el gel con extracto de bromelina. También se despliega la etiología del hematoma para cada paciente.

Tabla No. 6: Porcentaje del tiempo de desaparición de hematomas

| Paciente No. | Tiempo de desaparición del hematoma aplicando gel | Etiología del hematoma |
|---------------------|--|--|
| 1 | 7 días | Desconocida |
| 2 | 14 días | Venopunción |
| 3 | 7 días | Golpe contra objeto |
| 4 | 7 días | Picadura de mosquito |
| 5 | 5 días | Golpe por práctica de Karate |
| 6 | 3 días | Golpe por práctica de Fútbol |
| 7 | 4 días | Golpe contra objeto |
| 8 | 4 días | Golpe por práctica de artes marciales mixtas |
| 9 | 14 días | Golpe contra objeto |
| 10 | 7 días | Golpe por práctica de karate |
| 11 | 7 días | Golpe por natación |
| 12 | 7 días | Desconocida |
| 13 | 6 días | Golpe contra objeto |

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

En la tabla No. 7 se muestra los resultados de las respuestas del cuestionario realizado a los pacientes del estudio clínico, en la primera columna se indica la pregunta realizada y en las siguientes dos se presenta la frecuencia de las respuestas de los pacientes.

Tabla No.7: Evaluación del gel como antiinflamatorio

| Supuesto | Si (Frecuencia) | No (Frecuencia) |
|---|----------------------------|----------------------------|
| Utiliza productos para la disgregación de hematomas | 3 | 10 |
| Toma medicamento para la desinflamación del área del hematoma | 0 | 13 |
| Se inflama el área afectada | 7 | 6 |
| El gel ayudó a la desinflamación del área afectada | 10 | 3 |

Fuente: Datos experimentales

9. Discusión de Resultados

La determinación de la capacidad de la enzima bromelina para la disgregación de hematomas y disminución de la inflamación se determinó en diferentes fases en un estudio de tipo exploratorio.

El primer paso que se realizó fue la extracción de la enzima de la piña donde se obtuvo 3.5640g de Bromelina con un porcentaje de rendimiento de 0.594% y una actividad enzimática del extracto de 976.45 GDU (Unidades de Disolución de la Gelatina). El porcentaje de rendimiento y la actividad enzimática del extracto no dieron los resultados esperados en la propuesta inicial de este estudio. Por lo que no fue posible la utilización de la bromelina obtenida experimentalmente y se utilizó bromelina obtenida comercialmente. Debido a que para alcanzar los 5 gramos de extracto por unidad de gel (13 para fines de estudio) se necesita un promedio de más de 4,000 tallos de piña, pudiendo esto estar relacionado con el método de extracción empleado ya que se utilizó etanol al 95%. También el rendimiento se vió influido por el tamaño del tallo utilizado ya sea de una planta nueva o una adulta.

El preparado farmacéutico de aplicación tópica que se utilizó fue un gel a base de carbopol y agua. El cual presentaba una coloración beige y pH 5. El bajo pH no permitió que se pudiera conservar el gel, porque, al agregar la bromelina no se obtiene un preparado homogéneo, puesto que la enzima se activa rápidamente. De esa cuenta, era necesario elevar el pH a 7, por lo que se agregó trietanolamina antes de la bromelina. Cuando el gel contenía la enzima bromelina a un pH 7; se agregó una solución de ácido cítrico al 4% hasta llevar el gel a pH 5 para activar lentamente la enzima y evitar la separación en el preparado.

Para llevar a cabo la medición de la actividad enzimática del gel se determinó el peso de caseína de la leche que precipitó debido a que la bromelina posee acción proteolítica, es decir, capaz de “romper” las moléculas de las proteínas dejando libres los aminoácidos que las forman (Ver Antecedentes página 4). En la tabla No. 2 se observan la determinación inicial de la actividad enzimática, se realizaron 10 determinaciones del gel obteniendo un promedio de 1942.51 GDU, con una desviación estándar de 29.48 esto denota la dispersión

de los datos respecto del promedio obtenido. La mediana fue de 1935.48 GDU y la diferencia entre el dato mayor y menor fue de 77.95 unidades.

Se realizaron pruebas de estabilidad para establecer el comportamiento de la enzima en diferentes condiciones ya que las enzimas son moléculas que pueden modificar sus propiedades según las condiciones a las que son sometidas como pH y temperatura. Para realizar esta evaluación se sometió el gel a temperaturas de 35°C, 25°C y 4°C, evaluando el pH y la actividad enzimática para cada temperatura, resultados que se presentan en la tabla No. 3. La actividad enzimática inicial del gel fue de 1964.25 GDU, luego de 15 días la actividad enzimática a 35°C fue de 642.81 GDU, a 25°C fue de 1152.74 GDU mientras que a 4°C es de 2016.9 GDU, se observó mayor actividad en el gel almacenado a 4°C. Durante los 15 primeros días de la evaluación de la estabilidad del gel se observó que la enzima sufrió degradación ya que no solamente se observaron cambios en la actividad enzimática si no también se presentaron cambios físicos como la coloración, el gel a 35°C y 25°C cambiaron su coloración de beige a café y café oscuro respectivamente; lo cual fue un factor determinante para el estudio, cuyo objetivo era establecer las condiciones óptimas a las que el gel podría conservarse y así ser utilizado por los pacientes en la evaluación clínica. Debido a la degradación de la enzima se descartaron las pruebas de estabilidad acelerada a temperaturas de 35°C y 25°C por 3 meses y se continuaron las pruebas de actividad enzimática y pH a 4°C.

Durante 3 meses se realizaron pruebas al gel almacenado a 4°C estableciendo la actividad enzimática y pH a cada 15 días realizando las mediciones por duplicado. En la tabla No. 4 se puede observar que el pH inicial era de 7 a los 15 días no presentó cambio; a los 30 días se observó que el pH disminuyó a 5 y se mantuvo a los 45 y 60 días. El pH al que el gel presentó mayor estabilidad fue en 5 ya que se presentó homogeneidad sin cambios en la coloración. En cuanto a la actividad enzimática aumentó con el paso del tiempo observando la influencia del pH en la misma ya que entre más ácido se encontró el gel mayor fue su actividad enzimática. En la gráfica No.1 se observa el cambio de la actividad enzimática en relación con el tiempo del estudio de estabilidad del gel, se observa que a medida que aumenta el tiempo aumenta la actividad enzimática, en las mediciones a los días 0, 15 y 30 días se observa que los cambios no son mayores mientras que a los 45 y 60 días se puede

observar un cambio más grande, a los 90 días la actividad enzimática es muy cercana a la de los 60 días.

En la tabla No.5 se presentan los resultados de los análisis microbiológicos aplicados al gel, en donde se certifica que el preparado se encuentra libre de microorganismos patógenos y contaminantes. Garantizando así un producto no contaminado y seguro microbiológicamente para ser utilizado en la evaluación clínica.

En la evaluación clínica del producto se realizó un estudio fase I para lo cual se seleccionaron 13 personas que presentaban hematomas, debido a que constantemente estaban expuestos a golpes ya sea por sus actividades como prácticas deportivas o por fragilidad capilar. Se utilizó un instrumento para la medición de la acción del gel, en la tabla No. 6 se observa el tiempo en el que los pacientes mencionaron que desapareció el hematoma y también la etiología del mismo. Las 13 personas en el estudio indicaron que el gel ayudo a disminuir el tiempo de disgregación del hematoma ya que mencionaron que en otras ocasiones se disgrega en mayor tiempo. Algunos de los pacientes manifestaron que el hematoma no tuvo el proceso de coloración que normalmente presenta, si no que fue más rápida su desaparición. En algunos casos el paciente presentaba dos o más hematomas de tamaño similar y se aplicó el gel en uno de los dos, observando que al hematoma en el que se aplicó el gel se disgregó más rápido en comparación con el que no se utilizó el gel en el anexo No. 3, en la imagen No. 5 se observa la comparación de uno de los casos. El preparado con extracto de bromelina ayuda a la disgregación de hematomas ya que esta es una enzima con acción antitrombótica y fibrinolítica es decir que ayuda en la desaparición de los depósitos de fibrina formados por una reacción fibrosa encaminada a aislar el hematoma. Uno de los pacientes del estudio presentó una reacción adversa, pudiéndose presentar por sensibilidad a uno de los componentes remanentes en el gel como por ejemplo un solvente y se puede catalogar como un posible efecto secundario.

Se comprobó que la enzima bromelina posee acción antiinflamatoria, posteriormente a la aplicación del gel se cuestionó si el gel ayudó o no en la disminución de la inflamación, en la tabla No. 7 se observa que a 10 de 13 de las personas que utilizaron el gel les ayudó a disminuir la inflamación y también manifestaron que al utilizar el gel disminuía el dolor. Era importante saber si utilizaban productos cuando aparecía el hematoma para poder

establecer si el producto que utilizaban disminuía el hematoma, 3 personas de 13 mencionaron que sí utilizaban algún tipo de producto, dos utilizaban árnica y una utilizaba crema relajante muscular, ninguno de los dos productos poseen algún tipo de acción conocida para la disgregación de hematomas.

10. Conclusiones

- 10.1. El gel con extracto de bromelina es eficaz en la disgregación de hematomas.
- 10.2. El gel con extracto de bromelina disminuyó la inflamación en un 77% de pacientes.
- 10.3. La enzima bromelina posee actividad proteolítica al realizar la prueba utilizando caseína de leche.
- 10.4. El preparado farmacéutico con enzima bromelina es estable a temperatura de 4°C y pH de 5.
- 10.5. El gel con extracto de bromelina presenta una actividad enzimática que aumenta en relación al tiempo a una temperatura de 4°C.

11. Recomendaciones

- 11.1. Realizar estudios de estabilidad a largo plazo para determinar el tiempo en el que el gel con extracto de bromelina conserva sus propiedades físicas y químicas.
- 11.2. Emplear otro de extracción para obtener un mayor porcentaje de rendimiento del extracto de bromelina.
- 11.3. Incorporar el extracto de bromelina a otro tipo de preparado farmacéutico tópico para observar el comportamiento de la enzima.
- 11.4. Comprobar la acción de la enzima bromelina en la disminución de la inflamación de origen distinto a la producida por golpes y hematomas.

12. Referencias

Allevato, M. (2007). Sistemas Terapéuticos Transdérmicos (Versión electrónica). Recuperado el 20 de junio de 2012 de: www.fcv.unl.edu.ar

Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. (2004). Guía de Estabilidad de Productos Cosméticos Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (Versión electrónica). 1. ed. Brasil. Recuperado el 2 de julio de 2012 de: www.anvisa.gov.br

Alvarado, E. (2012). Evaluación de la actividad enzimática de la bromelina presente en el eje de la inflorescencia del fruto deshidratado de piña (*Ananas comosus (L.) Merr.*). Tesis Ingeniero Químico, Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.

Berdonces, J. (2008). El gran libro de la salud. Editorial Océano. España. Pp.143.

Bordes, R. et al. (2000). El proceso inflamatorio (Versión en electrónica). Recuperado el 16 de junio de 2012 de: www.uclm.es/ab/enfermeria/revista/numero%204/pinflamatorio4.htm

Blaht, W. (2011). Moretones y manchas de sangre debajo de la piel (Versión electrónica). Recuperado el 2 de julio de 2012 de: www.goodhealth.com

Budawari, S. (1996). The Merck Index. 12ª edición. Estados Unidos. Merck & Co. Inc. Pp. 1409.

Carrera, J. (2003). Producción y aplicación de enzimas industriales. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Vol.1 (1). Pp. 13.

Fernandez,E., Gálvan,A. (2000). Métodos para la cuantificación de proteínas (Versión electrónica). Recuperado el 13 de julio de 2012 de: www.creces.cl

Fernandez, M. (1990). Bromelina el lado útil de comer piñas (Versión electrónica). Recuperado el 12 de julio de 2012 de: <http://www.creces.cl>

Gallardo, L. et.al. (2009). Extracción de bromelina a partir de residuos de piña. México.

Garcia, P. (2008). Inflamación (Versión electrónica). Recuperado el 2 de julio de 2012 de: www.rac.es/ficheros/doc/00681.pdf.

García, I. (2000). Contusiones (Versión electrónica). Recuperado el 2 de julio de 2012 de: www.oc.lm.ehu.es

Hurtarte, A. (2004). Determinación de la perdida de bromelina presente en el fruto de la piña, debido a la aplicación de métodos de conservación que implican transferencia de calor. Tesis de Ingeniera Química Industrial, Universidad Rafael Landívar, Guatemala.

López, I., Díaz,J., & Merino,F. (1996). La bromelina una proteasa de interés comercial (Versión electrónica). Recuperado el 13 de julio de 2012 de: webs.uvigo.es/altaga/cyta/cyta-1-1996-17-22.pdf

Pamplona, R. (2002). Enciclopedia de los alimentos y su poder curativo, tratado de bromatología y dietoterapia. 1ª edición. Editorial Sefeliz, s.l. España. Pp. 189.

Hernández, M.et.al. (2003). Nueva tecnología para la obtención de un preparado de bromelina de tallo de piña. Biotecnología Aplicada Vol. 20 (3). Pp. 180-183

Pulido, A. (2007). Estudio técnico económico para la fabricación de bromelina (Versión electrónica). Recuperado el 12 de julio de 2012 de: www.itzamna.bnct.ipn.mx.

Piñol, S. et.al. (s.f.). Relación entre la absorción percutánea y la pérdida de agua transdérmica. Biofarmacia y Farmacocinética. Pp.443-445.

Piñero, E. (2009). La bromelina de la piña, nuevo complemento dietético. Recuperado el 12 de julio de 2012 de: www.articulos.sld.cu/diabetes/files/2009/07/la-bromelina-de-la-pina-nuevo-complemento-dietetico.pdf

Rodríguez, A., Trujillo, S. (2009). La piel como Vía de administración de fármacos formulados en parches transdérmicos. Revista OFIL Vol. 19(1).Pp.23-29

13. Anexos

Anexo No.1 Cuestionario para evaluación de la acción de la enzima bromelina

Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia
Escuela de Química Farmacéutica

Tesis: “Acción de Enzima Bromelina en disgregación de hematomas y disminución de inflamación”

Cuestionario Previo a la Aplicación de la crema

El cuestionario propuesto a continuación será utilizado para evaluar la acción de la crema con el extracto de bromelina sobre la disgregación de hematomas y disminución de inflamación.

1. Ocupación
2. Género (Masculino ó Femenino)
3. Edad
4. ¿En cuanto tiempo desaparece el hematoma formado normalmente?
 - a. Menos de una semana
 - b. 1 semana
 - c. 2 semanas
 - d. 3 semanas
 - e. 1 mes
 - f. Más de 1 mes
5. ¿Usted aplica algún producto en el área afectada Si, No? ¿Cuál o qué tipo de producto utiliza si su respuesta fue afirmativa?
6. ¿Toma algún medicamento para desinflamar el área afectada o ayudar a que desaparezca el hematoma?

Anexo No.2 Consentimiento informado

Yo _____ de _____ años de edad he sido informado sobre los beneficios que podría suponer la utilización de la crema con extracto de bromelina para cubrir los objetivos del proyecto de tesis titulado “Acción de la enzima bromelina en la disgregación de hematomas y disminución de la inflamación”.

He sido informado sobre los riesgos que puede ocasionar la utilización de la crema que pueden ser irritación o enrojecimiento en la piel.

Tomando ello en consideración, OTORGO mi CONSENTIMIENTO a que esta aplicación tenga lugar para cubrir los objetivos especificados en el proyecto.

Guatemala Agosto de 2012

Firma del paciente

Anexo No. 3: Imágenes del producto y del proceso de extracción

Imagen No. 1: Recolección de tallos de piña



Imagen No. 2: Jugo del tallo de piña obtenido



Imagen No. 3: Extracción de bromelina



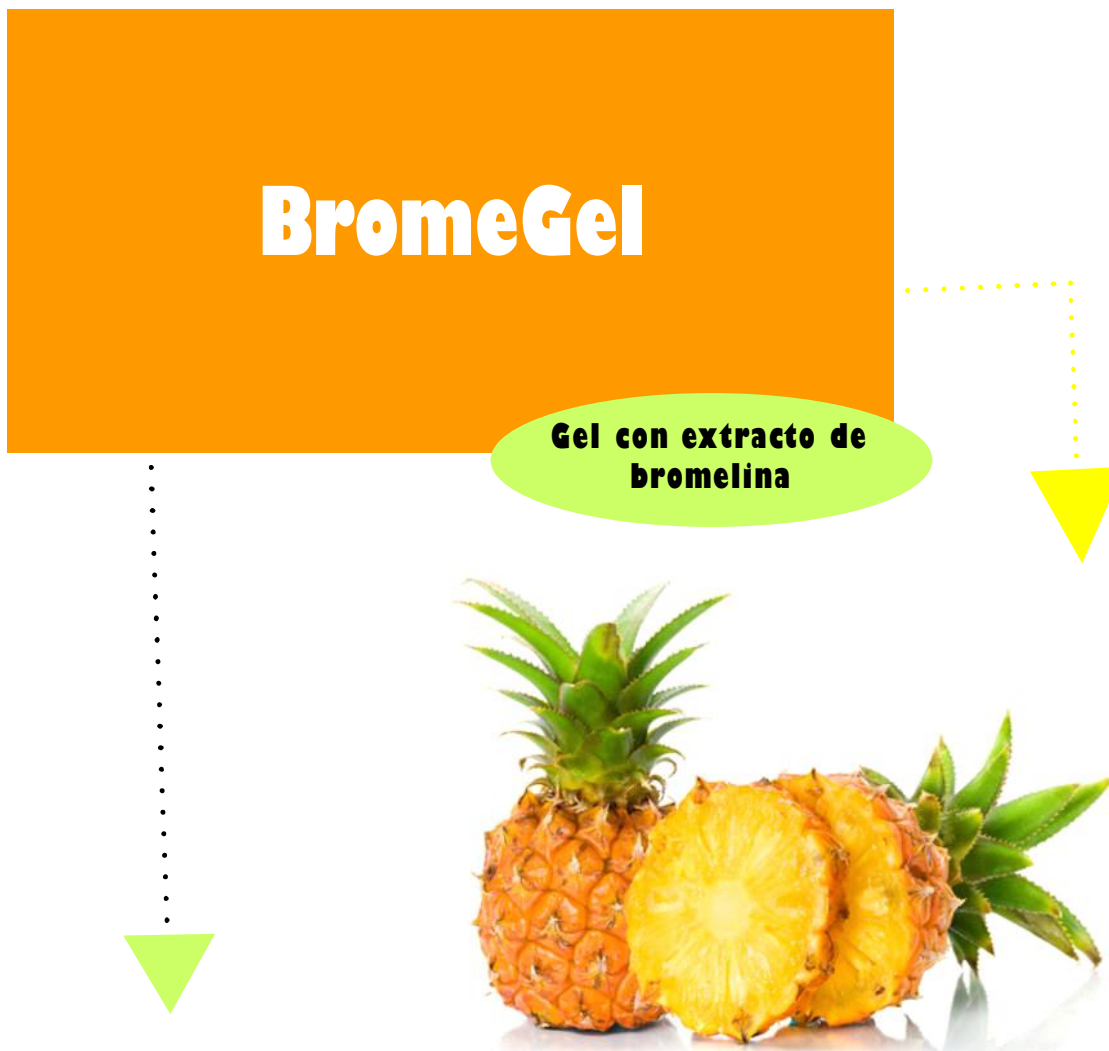
Imagen No. 4: Gel con extracto de bromelina



Imagen No. 5: Disgregación de hematomas



Anexo No. 4: Volante informativo del gel con extracto de bromelina.



BromeGel es un gel que contiene extracto de bromelina, enzima natural de la piña, que por sus propiedades fibrinolíticas ayuda a la reducción de hematomas

Ingredientes activos: Extracto de bromelina natural 16%

Uso: Disgregación de hematomas

Indicaciones de uso: Aplicar en el área afectada tres veces al día hasta que desaparezca e hematoma

Precauciones: USO EXTERNO. Evitar contacto con los ojos.

Evitar la exposición al sol de las áreas en donde se aplicó

BromeGel. Si presenta irritación informe lo mas pronto posible.

Otra información: REFRIGERAR

María José Chinchilla Reyes
Química Farmacéutica

Teléfono: 30299986

Correo:
mariajo903@hotmail.com

Anexo No. 5

Análisis Microbiológico

Universidad de San Carlos de
Guatemala



Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Laboratorio de Análisis Parasitológicos
y Microbiológicos LAFYM

1

Informe de Resultados de Análisis Microbiológico en Medicamentos

| | | | |
|----------------------|-----------------------|---------------------|----------|
| No. de ingreso: | 1192 | No. De muestra: | 1 (una) |
| Dirigido a: | Maria José Chinchilla | Ingreso: | 01/08/13 |
| Nombre del producto: | GEL TÓPICO | Inicio de análisis: | 01/08/13 |
| Presentación: | Gel | Reporte final: | 09/08/13 |
| Lote: | Sin número de lote | | |

| Análisis | Resultado | Dimensional | USP, 34 |
|-------------------------------|------------|---|--------------|
| Recuento Aeróbico Total | < 10 UFC/g | UFC/g (Agar PCA, 3-5 días/ 32.5 ± 2.5°C) | ≤ 1000 UFC/g |
| Recuento de Mohos y Levaduras | < 10 UFC/g | UFC/g (Agar PDA, 7 días/22.5 ± 2.5°C) | ≤ 100 UFC/g |
| <i>Escherichia coli</i> | Ausencia | Sin dimensionales (Caldo Lactosado, Agar MeK, 4 días/32.5 ± 2.5°C) | Ausencia |
| <i>Salmonella typhi</i> | Ausencia | Sin dimensionales (Caldo Lactosado, Agar BPLS, 4 días/32.5 ± 2.5°C) | Ausencia |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Ausencia | Sin dimensionales (Caldo Trypticase soya, Agar VJ, 4 días/32.5 ± 2.5°C) | Ausencia |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Ausencia | Sin dimensionales (Caldo Trypticase soya Agar Cetrimida, 4 días/32.5 ± 2.5°C) | Ausencia |

Conclusión:

La muestra recibida y analizada en el laboratorio CUMPLE.

*Métodos de Referencia: Farmacopea USP 34

*Prohibida la parcial o total reproducción por el cliente u otra persona, sin la debida autorización escrita por parte del laboratorio LAFYM

*Este informe pertenece única y exclusivamente a la muestra descrita, tal y como fue recibida en el laboratorio.

1. Nomenclatura utilizada:

UFC/g
PCA
BPA

Unidades Formadoras de Colonia por gramo
Plate Count Agar
Agar Papa Dextrosa

MeK
BPLS
VJ

Agar MacConkey
Agar Difco Lactosa Selenita
Agar Vogel Johnson

Elisa Reyes OB
Analista



Lidia Amparado de Heredia, OB
Garantía de Calidad

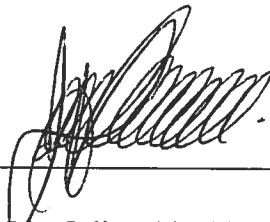
Lidia Amparado de Heredia, OB
LABORATORIO DE ANÁLISIS
PARASITOLÓGICOS Y
MICROBIOLÓGICOS
LAFYM
PROGRAMA DFC

3^a Calle 6-47 zona 1
Teléfono: 22531319 Fax: 22205613
lafym@unescar.com



Br. María José Chinchilla Reyes

Tesista



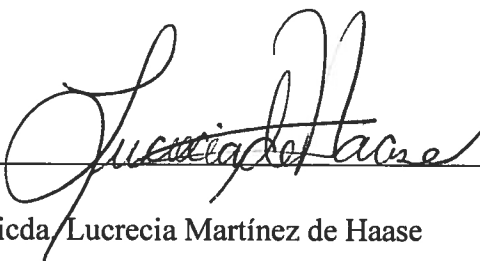
Lic. Julio Chinchilla

Asesor de Tesis



Lic. Estuardo Serrano

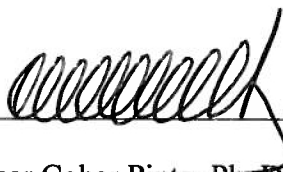
Revisor de Tesis



Licda. Lucrecia Martínez de Haase

Directora de Escuela

Química Farmacéutica



Dr. Oscar Cobar Pinto, Ph. D.

Decano

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia