

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

**Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la  
Producción**

“Extracción, Caracterización y Secado por Aspersión de  
Bromelina Cruda Obtenida a Partir de Residuos de Piña  
“Perolera” (*Anana Comosus*)”

**TESIS DE GRADO**

Previo a la Obtención del Título de:

**INGENIEROS DE ALIMENTOS**

Presentada por:

John Roberto Magallanes Fernández

Nancy María Salcedo Villón

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2013

## AGRADECIMIENTO

Agradecemos a Dios quien nos ha permitido estar hoy presentes y nos ha llenado de bendiciones, inteligencia y fuerza para ser las personas que somos.

A Nuestra directora de tesis la Ing. Priscila Castillo quien depositó plena confianza en nosotros para la realización de esta tesis.

Al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, CIBE, que abrió sus puertas cordialmente y prestó ayuda en todo momento para la elaboración de nuestra tesis.

*John Magallanes, Nancy Salcedo*

## DEDICATORIA

Ante todo a mis padres Jacqueline y Roberto, quienes son mi ejemplo y razón de cada día seguir adelante dando lo mejor de mí con su apoyo incondicional.

A mi hermana Katherine y a toda mi familia quienes de alguna forma u otra siempre han apoyado y confiado en mí.

A mis amigos con quienes he compartido las mejores etapas de mi vida y quienes siempre me han tenido presente.

*John Magallanes Fernández*

## DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a mis padres, Mario y Nancy, porque han estado conmigo en todo momento de mi vida, por ser mi guía, mi apoyo y por ser la excelente persona que soy.

A mis hermanas, Vanessa y Gloria, por su ayuda incondicional cuando vivíamos solas en esta ciudad.

A Paúl Urjilez por no dejarme caer frente a las adversidades, por ser mi fuerza y mi protector a lo largo de todo este tiempo que hemos pasado juntos.

*Nancy Salcedo Villón*

## TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

---

Dr. Kleber Barcia V., Ph.D.  
DECANO DE LA FIMCP  
PRESIDENTE

---

Ing. Priscila Castillo S.  
DIRECTORA DE TESIS

---

Dr. Efrén Santos O.  
VOCAL

## DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, nos corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral”

(Reglamento de Graduación de la ESPOL).

---

John Roberto Magallanes Fernández

---

Nancy María Salcedo Villón

## RESUMEN

El objetivo de esta tesis es analizar e identificar los residuos de piña “Perolera” (*Anana comosus*) con las mejores propiedades para ser utilizados como materia prima para la obtención y secado por aspersion de bromelina cruda con alta actividad proteolítica.

Del recinto “El rosario” ubicado en la vía Naranjito-Bucay se recolectó frutos semi maduros y tallos de piña *Anana Comosus* variedad Perolera, los cuáles fueron cepillados, lavados y enjuagados. Se separó la cáscara del fruto y la corteza del tallo para poder ser triturados y puestos en refrigeración a una temperatura de 5°C.

Tanto para cáscara y tallo se procedió a realizar el proceso de extracción por separado mediante la adición de un buffer de extracción compuesto de ácido sulfúrico y sulfuro de sodio. Las mezclas se homogenizaron en un baño de hielo por 40 minutos, posteriormente se filtraron y recolectó los líquidos que se centrifugaron a 5°C a 8500 rpm por 30 minutos. Terminada la etapa de centrifugación se eliminaron los precipitados y se recolectaron los sobrenadantes para refrigerarlos a una temperatura de 5°C.

Obtenidos los extractos de bromelina cruda de cáscara y tallo se procedió a medir los parámetros químicos como el pH, grados Brix y concentración de proteínas. Además se midió la actividad proteolítica por el método de la unidad de digestión de la gelatina del cual se obtuvieron valores promedio de 648 GDU/g para extracto de bromelina cruda de cáscara y 893 GDU/g para extracto de bromelina cruda de tallo. Se ingresó los valores al programa estadístico Minitab 16 para conocer si existía diferencia significativa entre las medias de las actividades proteolíticas de los extractos de bromelina cruda de cáscara y tallo. Este último fue seleccionado por presentar las características de; poseer mayor actividad proteolítica, pH estable y de ser el residuo más accesible en la post cosecha del fruto.

A continuación se micro encapsuló con goma arábiga en una concentración del 15% de la masa total de la muestra y se secó en un secador tipo spray dryer a una temperatura de entrada del aire de 65°C a un flujo de 4 ml/min. Obtenido el polvo de bromelina cruda seca de tallo se midieron los parámetros físicos químicos como humedad, actividad de agua, pH, actividad proteolítica y concentración de proteínas usando el método de la reacción de Biuret. Los resultados de los ensayos fueron analizados en el programa estadístico Minitab 16 y se comprobó que existía diferencia significativa entre las actividades proteolíticas del extracto de bromelina cruda de tallo y el polvo de bromelina cruda seca de tallo tras la operación de secado, puesto



que se obtuvieron valores promedios de 893 GDU/g para el extracto de bromelina cruda de tallo y 403 GDU/g para bromelina cruda seca de tallo.

Como opción para mejorar la protección de la actividad proteolítica de la enzima se realizó un diseño de experimentos en el que se demostró que sí existe influencia en la actividad proteolítica de la enzima por el uso de los agentes microencapsulantes; goma arábica y maltodextrina, y el uso sulfato de zinc como agente protector. Para ello se elaboraron lotes de; bromelina cruda seca micro encapsulada con goma arábica y agente protector, bromelina cruda seca de tallo micro encapsulada con maltodextrina con y sin agente protector. Se midieron las actividades proteolíticas y fueron analizadas en el programa estadístico Minitab 16. Como respuesta se demostró que el agente protector influye significativamente sobre la actividad proteolítica de la enzima ya que micro encapsular con goma arábica y adicionar sulfato de zinc se obtiene una actividad proteolítica promedio de 980 GDU/g y micro encapsular con maltodextrina y sulfato de zinc una actividad proteolítica promedio de 840 GDU/g.

Al finalizar se concluyó que los tallos de piña Perolera son residuos agrícolas de los cuales se pueden obtener extractos de bromelina cruda secado por aspersión con alta actividad proteolítica mediante el uso de goma arábica y sulfato de zinc.

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN .....	I
ÍNDICE GENERAL.....	IV
ABREVIATURAS .....	VIII
SIMBOLOGÍA .....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE TABLAS .....	XII
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1	
1. GENERALIDADES.....	4
1.1. Piña.....	4
1.1.1. Variedades y Cultivos en el País .....	4
1.1.2. Características físico-químicas.....	6
1.1.3. Productos derivados.....	8
1.2. Bromelina.....	8
1.2.1. Aspectos generales .....	9
1.2.2. Fuentes principales .....	9
1.2.3. Características y Propiedades.....	9
1.3. Extracción.....	10

1.3.1. Tratamientos previos .....	10
1.3.2. Métodos de extracción.....	10
1.3.3. Ventajas y desventajas.....	10
1.4. Secado.....	11
1.4.1. Métodos de Secado.....	11
1.4.2. Secado por aspersion.....	11
1.4.3. Micro encapsulación .....	12
1.5. Cuantificación de proteínas .....	12
1.5.1. Métodos para la cuantificación de proteínas .....	12
1.6. Medición de la actividad proteolítica .....	13
1.6.1. Fundamento .....	13
1.6.2. Métodos de determinación de la actividad proteolítica .....	13
1.6.3. Unidades Enzimáticas .....	14
1.7. Aplicaciones industriales.....	14

## CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	16
2.1. Preparación de Muestra.....	16
2.2. Proceso de Extracción .....	18
2.2.1. Materiales, Reactivos y Equipos.....	18
2.2.2. Metodología.....	19
2.3. Caracterización del Extracto de Bromelina Cruda .....	20

2.3.1. Medición de Parámetros Químicos.....	20
2.3.2. Medición de Actividad Proteolítica .....	21
2.4. Proceso de Secado .....	22
2.4.1. Materiales y Equipo .....	22
2.4.2. Micro encapsulación.....	23
2.4.3. Metodología.....	23
2.5. Caracterización de la Bromelina Cruda Seca .....	24
2.5.1. Medición de Parámetros Físicos Químicos .....	24
2.5.1.1. Humedad.....	25
2.5.1.2. Actividad de Agua .....	25
2.5.1.3. pH.....	26
2.5.2. Determinación de la Cantidad de Proteínas .....	26
2.5.2.1. Materiales, Reactivos y Equipos .....	26
2.5.2.2. Metodología.....	27
2.5.3. Determinación de la Actividad Proteolítica .....	28
2.5.3.1. Materiales y Reactivos .....	28
2.5.3.2. Metodología.....	30
2.6. Diseño Experimental.....	30
2.6.1. Planteamiento del Problema.....	30
2.6.2. Selección del Modelo .....	30
2.6.2.1. Variables del Experimento.....	31
2.6.3. Hipótesis.....	31

## CAPÍTULO 3

3. ANÁLISIS Y RESULTADOS.....	33
3.1. Análisis Estadístico de Resultados .....	33
3.1.1. Pruebas para Extractos de Bromelina Cruda .....	33
3.1.1.1. Caracterización y Rendimientos.....	33
3.1.1.2. Actividad Proteolítica .....	34
3.1.2. Pruebas para Bromelina Cruda Seca .....	45
3.1.2.1. Caracterización y Rendimientos.....	45
3.1.2.2. Actividad Proteolítica .....	47
3.1.3. Análisis de Diferencias Significativas entre Actividades Proteolíticas de Extracto y Bromelina Cruda Seca .....	49
3.2. Análisis Estadístico del Diseño de Experimento .....	55
3.2.1. Datos y Resultados Obtenidos .....	56
3.2.2. ANOVA.....	57
3.2.3. Discusión .....	60

## CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	62
--	----

## ANEXOS

## BIBLIOGRAFÍA

## ABREVIATURAS

ác	Ácido
Aw	Actividad de agua
Ec.	Ecuación
°C	Grados Centígrados
g	Gramos
kDa	KiloDalton
kg	Kilogramos
mg	Miligramo
mL	Mililitro
nm	Nanómetro
Pág.	Página
pH	Potencial Hidrógeno
et. al.	Y otros
T	Temperatura
GDU	Unidades de Digestión de la Gelatina

## SIMBOLOGÍA

°	Grado
$H_1$	Hipótesis Alternativa
$H_0$	Hipótesis Nula
%	Porcentaje
$\mu$	Micras

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1.1 Piña Variedad Cayena Lisa .....	5
FIGURA 1.2 Piña Variedad Golden Sweet. ....	5
FIGURA 1.3 Piña Variedad Perolera .....	6
FIGURA 2.1 Metodología de Preparación de la Muestra final de Estudio ...	17
FIGURA 2.2 Centrífuga.....	18
FIGURA 2.3 Procedimiento para la Obtención de Extracto de Bromelina Cruda .....	20
FIGURA 2.4 Spray Dryer .....	22
FIGURA 2.5 Espectrofotómetro .....	27
FIGURA 2.6 Baño de Agua Termostatizado .....	29
FIGURA 3.1 Estadística Descriptiva del Extracto de bromelina Cruda de Cáscara de Piña .....	38
FIGURA 3.2 Estadística Descriptiva del Extracto de Bromelina Cruda de Tallo de Piña.....	39
FIGURA 3.3 Estadística Descriptiva del Extracto crudo de cascara de Piña	41
FIGURA 3.4 Grafica de Cajas para la Diferencia de Medias entre los Extractos Crudos de Tallo y Cáscara de Piña.....	42
FIGURA 3.5 Estadística Descriptiva de extracto Bromelina Cruda de Tallo .....	50
FIGURA 3.6 Estadística Descriptiva de Bromelina Cruda seca de Tallo	51



FIGURA 3.7 Prueba t para la Diferencia de Medias entre el Extracto Crudo y Bromelina Cruda Seca de Tallo de Piña .....	52
FIGURA 3.8 Gráfica de Cajas para la Diferencia de Medias entre el Extracto de Bromelina Cruda y Bromelina Cruda Seca de Tallo de Piña.....	53
FIGURA 3.9 Anova de dos factores para Bromelina Cruda Seca de Tallo .....	57
FIGURA 3.10 Grafica de Efectos Principales para la Actividad Proteolítica de la Enzima.....	58
FIGURA 3.11 Grafica de Cajas de Actividad Proteolítica Resultante de Combinar el Agente Microencapsulante y el Agente Protector	59

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1 Características Físico-Químicas de la Piña .....	7
TABLA 2 Parámetros de Recolección de Piña para Extracción de Bromelina Cruda .....	16
TABLA 3 Parámetros Químicos del extracto crudo de piña .....	34
TABLA 4 Volumen de la titulación de la solución blanco y solución prueba de los extractos crudos de piña .....	35
TABLA 5 Actividad proteolítica de cada extracto de piña .....	36
TABLA 6 Actividades proteolíticas del Estudio Realizado en India .....	43
TABLA 7 Parámetros Físicos Químicos de Bromelina Cruda Seca de Tallo .....	46
TABLA 8 Volumen de la Titulación de la Solución Blanco y Solución Prueba de Bromelina Cruda Seca de Tallo.....	48
TABLA 9 Actividad Proteolítica de Bromelina Cruda.....	49
TABLA 10 Actividad proteolítica de Bromelina Cruda Seca de Tallo .....	56

## INTRODUCCIÓN

Ecuador es un país agrícola con una amplia gama de productos hortofrutícolas, entre ellos la piña (*Ananas comosus*) un fruto tropical perteneciente a la familia botánica *Bromeliaceae* de las variedades; “Cayena Lisa” o más conocida como Hawaiana utilizada mayormente en industrias de enlatados, “Golden Sweet” o Súper dulce que está orientado a la exportación y la “Perolera” o Milagreña que es de consumo en el mercado nacional (1,2).

La planta y el fruto de piña (*Ananas comosus*) son fuente de un grupo de enzimas, entre ellas una cisteína-proteasa llamada comúnmente Bromelina que es empleada en la industria alimenticia como ablandador de carnes y clarificador de cervezas, además de diversos usos en la industria farmacéutica y cosmética (3).

En nuestro país, el mercado industrial y minorista utiliza del fruto la pulpa para el procesamiento y posterior consumo, mientras que el tallo y cáscara son desechados, sin conocer que estos pueden ser aprovechados para ser procesados y obtener subproductos como la bromelina.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

¿Qué residuos de piña de variedad Perolera o Milagreña tiene las mejores propiedades para poder obtener bromelina cruda y que tras la operación de secado por aspersion se pueda obtener una enzima con alta actividad proteolítica mediante el empleo de agentes microencapsulantes y protectores?

## **HIPÓTESIS DEL PROYECTO**

El agente protector sulfato de Zinc y el tipo de microencapsulante; maltodextrina y goma arábica influyen positivamente sobre la actividad proteolítica de la enzima bromelina obtenida a partir de tallos de piña “Perolera” *Anana comosus* tras la operación de secado por aspersion.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Analizar e identificar los residuos de piña “Perolera” (*Anana comosus*) con las mejores propiedades para ser utilizados como materia prima para la obtención y secado por aspersion de bromelina cruda con alta actividad proteolítica mediante el uso de agentes microencapsulantes y protectores.

### Objetivos Específicos

- Extraer y caracterizar bromelina cruda a partir de cáscara y tallo de piña “Perolera” (*Anana comosus*) mediante el empleo de un buffer compuesto de ácido sulfúrico y sulfuro de sodio.
- Medir la actividad proteolítica de los extractos de bromelina cruda de cáscara y tallo de piña y determinar cuál es el extracto con mejor actividad proteolítica.
- Secar por aspersion el extracto con mejor actividad proteolítica, caracterizar y calcular el rendimiento del proceso de obtención del polvo de bromelina.
- Medir la actividad proteolítica de la bromelina cruda seca, comparar con los valores obtenidos del extracto de bromelina cruda y evaluar la variabilidad de las mismas.
- Diseñar un experimento de arreglo factorial  $2^2$  con 3 repeticiones para conocer si el agente protector y el tipo de microencapsulante influyen en la actividad proteolítica de la bromelina tras la operación de secado por aspersion.

# CAPÍTULO 1

## 1.GENERALIDADES

### 1.1.Piña

La piña conocida científicamente como *Ananas comosus*, pertenece a la familia Bromeliáceae, al género Ananas. Las Bromeliáceas son originarias de América Latina, exactamente de América del Sur (4).

#### 1.1.1. Variedades y Cultivos en el País

##### Variedades de Piña

Las variedades de piña (Ananás) producidas en Ecuador para exportación son las siguientes:

- La Cayena Lisa, más conocida como Champaca o Hawaiana (FIGURA 1.1), utilizada mayormente en la agroindustria.



FIGURA 1.1 Piña Variedad Cayena Lisa  
Fuente: Pro Ecuador

- La Golden Sweet o también conocida como MD2 (FIGURA 1.2), la cual se caracteriza por su sabor dulce, tamaño y aroma. Esta variedad es la más exportada en Ecuador (1).



FIGURA 1.2 Piña Variedad Golden Sweet.  
Fuente: Pro Ecuador

La variedad para consumo nacional en fresco es la piña tipo “Perolera” o “Milagreña” (FIGURA 1.3), originaria del Brasil. Posee un corazón grueso y pulpa blanca, característica que hace que sea muy poco usada para la industrialización (2).



FIGURA 1.3 Piña Variedad Perolera  
Fuente: Alvarado, 2006

### **Cultivo en Ecuador**

La piña al ser una fruta tropical la encontramos cultivada en provincias de la Costa, en primer lugar resalta Guayas, seguido de los Ríos, Santo Domingo de los Tsáchilas, El Oro, Esmeraldas y Manabí. Las tres primeras provincias mencionadas son las que poseen mejores condiciones para la producción de piña. La disponibilidad de la piña se da durante todo el año permitiendo así asegurar el abastecimiento en los destinos de exportación (1).

#### **1.1.2. Características físico-químicas**

Las características físico-químicas de la piña se detallan en la TABLA 1.



TABLA 1

**Características Físico-Químicas de la Piña**

Parámetro físico-químico	Valor
Grados Brix	10,80-17,50
Acidez titulable (% ác. cítrico)	0,60-1,62
% de cenizas	0,30-0,42
% de agua	81,20-86,20
% de fibra	0,30-0,61
% de nitrógeno	0,045-0,115
% de extracto etéreo	0,2
Esteres (ppm)	1,00-250
Pigmentos (ppm de carotenos)	0,2-2,5
% en peso de glucosa	1,00-3,20
% en peso de fructosa	0,6-2,3
% en peso de sacarosa	5,9-12,0
% de almidón	<0,002
% de celulosa	0,43-0,54
% de hexosas	0,10-0,15
% de pentosas	0,33-0,43

Fuente: Hulme, 1971

La piña posee una alta concentración de sólidos solubles (10-17 °Brix) y un contenido de agua entre el 81% y el 86%. Su aroma característico se debe a la presencia de esteroides en el fruto (5).

Además la piña contiene enzimas, entre ellas podemos mencionar a la bromelina, fosfatasa ácida, ananina, carboxipeptidasa, celulasa, peroxidasa y fosfatasa (6).

### 1.1.3. Productos derivados

Por su sabor dulce la piña puede ser consumida como fruta fresca o puede ser destinada para la elaboración de productos como (1):

- Jugos
- Conservas en almíbar
- Mermelada
- Pulpa o puré

Además, la piña contiene bromelina, una enzima cisteína-proteasa distribuida en todo el fruto, tallo y hojas, que puede ser aislada para ser usada en la industria por su actividad proteolítica.

## 1.2. Bromelina

El nombre bromelina fue dado originalmente a una mezcla de proteasas encontradas en los tejidos de la planta de piña (*Ananas comosus*) (7).

### **1.2.1. Aspectos generales**

La bromelina es una glicoproteína de cadena simple que tiene un peso molecular de 24,5 kDa. Contiene 212 aminoácidos reductores, incluyendo 7 cisteínas. La enzima proteolítica encontrada en el extracto del tallo de la planta es llamada “bromelina de tallo” y la encontrada en el jugo del fruto de piña se denomina “bromelina del fruto” (7).

### **1.2.2. Fuentes principales**

La producción de bromelina a escala industrial se centra en la obtención de la enzima a partir del tallo de la planta de piña por ser un subproducto de su explotación, aunque el procedimiento puede aplicarse a cualquier parte del fruto y planta, como el tallo, las hojas, la cascara (3).

### **1.2.3. Características y Propiedades**

La bromelina pura de tallo es estable cuando se la almacena a -20°C. Tiene un pH óptimo entre 6-8,5 y la temperatura optima es de 50 a 60°C (7).

### **1.3.Extracción**

#### **1.3.1. Tratamientos previos**

Una vez recolectado el fruto y el tallo de la planta de piña se lavan, se cortan y se realiza la extracción del jugo por separado, esto depende del método a seguir. Se puede macerar la muestra en un mortero con agua destilada, decantarla y colocarla en un baño de hielo. Otro método sería licuarla con un regulador de fosfatos pH 7,5, también se podría molerla en un extractor de jugos (8).

#### **1.3.2. Métodos de extracción**

La obtención de bromelina se realiza mediante la adición de agentes precipitantes como la acetona, el etanol, el metanol, isopropanol y sulfato de amonio, al jugo del tallo de piña (3).

#### **1.3.3. Ventajas y desventajas**

La obtención de bromelina mediante la adición de acetona es recomendada por su alto rendimiento, ya que la acetona en este proceso puede ser recuperada en estado relativamente puro (3).

## **1.4. Secado**

### **1.4.1. Métodos de Secado**

Se realizan distintos tipos de secado al extracto de bromelina cruda, secado por liofilización, secado al vacío y secado por aspersión.

### **1.4.2. Secado por aspersión**

El principio de este sistema es la obtención de un producto en polvo basándose en la evaporación rápida de una muestra líquida por pulverización en una cámara de atomización en la que se introduce aire caliente. El líquido se evapora rápidamente separándose las partículas sólidas, y cayendo por gravedad en un colector (9).

Un secador spray consta de las siguientes elementos (10):

- Atomizador
- Cámara de secado
- Zona de flujo de aire caliente
- Extracción de aire caliente de la cámara de secado
- Sistema de transporte y enfriamiento

### **1.4.3. Micro encapsulación**

Consiste en recubrir partículas sólidas diminutas con una capa delgada de material protector. El método más usado en la industria alimentaria para micro encapsular es el secado por aspersión, en donde se seca por atomización la suspensión del material que se quiere cubrir en la solución del material de recubrimiento (11).

## **1.5. Cuantificación de proteínas**

### **1.5.1. Métodos para la cuantificación de proteínas**

Existen varios métodos para determinar la cantidad de proteínas presentes en una muestra. Los métodos más usuales son:

- Reacción del Biuret
- Método de Lowry
- Método de Bradford
- Método del ácido Bicincónico
- Absorción en el ultravioleta
- Métodos inmunológicos

### **Reacción del Biuret**

La reacción del biuret es un método colorimétrico, su nombre se debe a la reacción de un compuesto coloreado formado por la condensación de dos moléculas de urea con la eliminación de amoníaco. La solución de proteína al reaccionar con el reactivo de Biuret formara una complejo entre el ion cúprico y los enlaces peptídicos con la aparición de una coloración violeta-purpura, de un máximo de absorción de 540 nm (12).

## **1.6. Medición de la actividad proteolítica**

### **1.6.1. Fundamento**

Determinar la cantidad de extracto consumido, de producto formado o el número de acciones elementales realizadas por unidad de tiempo, en condiciones estandarizadas (13).

### **1.6.2. Métodos de determinación de la actividad proteolítica**

Para la determinación de la actividad proteolítica de las enzimas existen varios métodos, mencionaremos los dos principales métodos empleados en la medición de bromelina:

- Método Analítico para la Unidad de Digestión de la Gelatina (GDU)

- Método Analítico para la Unidad de Digestión de la Caseína (CDU)

### 1.6.3. Unidades Enzimáticas

GDU: Cantidad de enzima que libera 1 mg de nitrógeno amino de una solución estándar de gelatina a pH 4,5 después de 20 minutos de digestión (14).

CDU: cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{g}$  de tirosina después de 1 minuto de digestión a 37°C en un sustrato estándar de caseína a un pH de 7,0 (14).

U: Cantidad de enzima necesario para transformar un micromol de sustrato por minuto, a 25°C y en condiciones estandarizadas (13).

## 1.7. Aplicaciones industriales

Su uso en la industria alimentaria se da para:

- Ablandador de carnes
- La clarificación de la cerveza
- La fabricación de quesos
- La preparación de alimentos infantiles y dietéticos



En la industria textil para:

- El tratamiento del cuero
- El tratamiento de la seda

En la industria farmacéutica para el tratamiento de:

- Trastornos digestivos
- Heridas
- Inflamaciones (3).

# CAPÍTULO 2

## 2.MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1.Preparación de Muestra

Para la obtención de las muestras, se recolectaron aleatoriamente piñas de un sembrío ubicado en el recinto “El Rosario” en la vía Naranjito – Bucay. En la TABLA 2 se muestra los parámetros de recolección del fruto.

**TABLA 2**

**Parámetros de Recolección de Piña para Extracción de Bromelina Cruda**

Variedad del fruto	<b>Perolera</b>
Edad del fruto	4 meses
Estado de madurez	Semi-maduras
Tamaño del fruto	Medianas
Extracción del fruto de la planta	Desde la Parte basal del tallo

Elaborado por: John Magallanes – Nancy salcedo, 2013

Una vez realizada la recolección se trasladaron los frutos hacia el laboratorio I+D de la FIMCP, en donde se procedió a lavar y cepillar los frutos en una solución de cloro 2 ppm y enjuagar con abundante agua destilada.

A continuación se presenta un esquema de la metodología para la preparación de la muestra final de estudio:

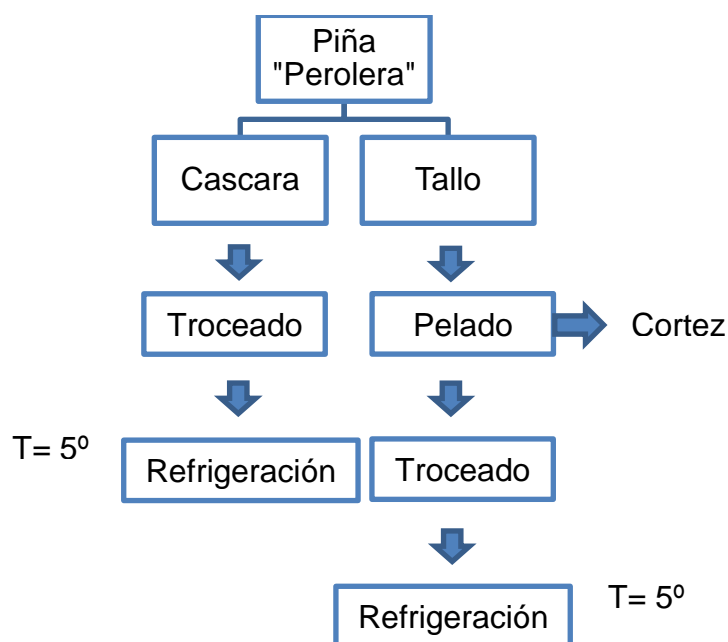


FIGURA 2.1 Metodología de Preparación de la Muestra final de Estudio

Elaborado por: John Magallanes – Nancy salcedo, 2013

## 2.2. Proceso de Extracción

### 2.2.1. Materiales, Reactivos y Equipos

#### Materiales

- Vasos precipitados
- Agitadores
- Probetas
- Embudos
- Papel filtro whatman #6
- Tubos para centrífuga

#### Reactivos

- Buffer de extracción pH 4.5

#### Equipos

- Triturador
- Centrífuga Refrigerada



FIGURA 2.2 Centrífuga

Elaborado por: John Magallanes – Nancy salcedo, 2013

### **2.2.2. Metodología**

La metodología que se optó para el proceso de extracción fue desarrollada por el centro de Bioplasmas de Cuba (15) con ligeras modificaciones; cuyo fundamento es la obtención de un extracto estable y con actividad enzimática recuperable mediante la combinación de sulfuro de sodio, para la protección de los grupos SH- del centro activo, y ácido sulfúrico que permite que el procedimiento se realice a un pH alejado del óptimo y así disminuir la auto proteólisis.

En el siguiente esquema se detalla la metodología empleada para el proceso de extracción de Bromelina cruda.

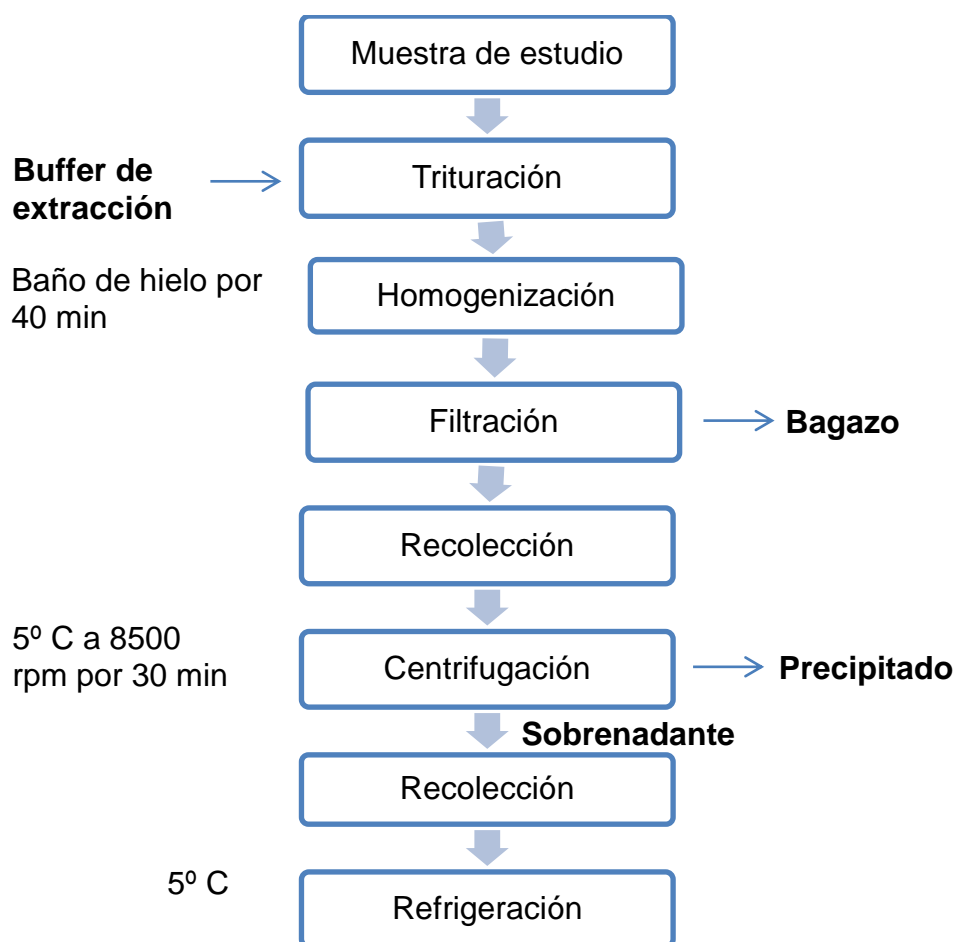


FIGURA 2.3 Procedimiento para la Obtención de Extracto de Bromelina Cruda  
Elaborado por: John Magallanes – Nancy salcedo, 2013

## 2.3. Caracterización del Extracto de Bromelina Cruda

### 2.3.1. Medición de Parámetros Químicos

#### Determinación de pH

Se tomó 15 ml del extracto de bromelina de tallo y cáscara por separado en vasos precipitados y se procedió a tomar lectura del pH de cada muestra con el electrodo del potenciómetro.

### **Medición de Sólidos Solubles Totales (°Brix)**

Con un gotero se tomó muestras de extracto de bromelina de tallo y cáscara las cuales fueron colocadas en un refractómetro previamente limpio y calibrado. Posterior se tomó lectura del valor indicado en la escala.

#### **2.3.2. Medición de Actividad Proteolítica**

El método que se optó para la medición de la actividad proteolítica es el método analítico para la unidad de digestión de gelatina GDU desarrollado por Enzyme Development Corporation (14). Se fundamenta en la capacidad que tiene la bromelina en hidrolizar la gelatina a temperaturas y pH establecidos.

Para el procedimiento se tomaron 0.05 g de extractos de bromelina de tallo y cáscara y se prosiguió con el análisis correspondiente.

## 2.4. Proceso de Secado

### 2.4.1. Materiales y Equipo

#### Materiales

- Vasos precipitados
- Agitadores
- Agua destilada
- Extracto de bromelina cruda
- Goma arábica
- Maltodextrina

#### Equipos

- Secador Spray Dryer



FIGURA 2.4 Spray Dryer  
Fuente: KURE JORGE; YUGCHA ANDREA, 2013



Se utilizó un secador de marca Armfield, modelo FT30 MK III (FIGURA 2.4) el cual nos permitió regular el caudal de flujo y la temperatura del aire de entrada, en relación a la temperatura de salida por diseño propio del equipo no se la puede controlar pero si apreciar en el equipo (16).

#### **2.4.2. Micro encapsulación**

Para el procedimiento de micro encapsulación se tomó 70 ml de extracto de bromelina cruda que fue mezclada y homogenizada con una solución de goma arábica correspondiente al 15% del volumen total del extracto como micro encapsulante.

#### **2.4.3. Metodología**

##### **Preparación del Secador Spray Dryer**

Se encendió el equipo y se reguló la temperatura de entrada a 65°C, una vez alcanzada dicha temperatura se procedió a encender la bomba peristáltica y a realizar una limpieza del sistema de circulación haciendo pasar agua destilada a través de él, alrededor de 10 minutos. El equipo indicó una temperatura de salida constante de 50°C en la que se procedió con el secado inmediato de la muestra.

### **Secado de la Muestra**

Para la operación de secado se realizaron los pasos detallados a continuación:

1. Se tomó el vaso precipitado con la muestra micro encapsulada de bromelina cruda de tallo y se le colocó la manguera de succión del secador.
2. Se reguló la bomba peristáltica a 4 ml x Min.
3. Iniciada la succión se esperó hasta vaciar el contenido del vaso precipitado.
4. Terminada la etapa de succión se apagó el equipo y dejó en reposo hasta que enfríe.
5. Luego se recolectó el polvo de bromelina cruda seca del ciclón que se hallaba en el frasco recolector y se lo colocó en fundas rotuladas para sellar al vacío.
6. Finalmente se almacenaron a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **2.5. Caracterización de la Bromelina Cruda Seca**

### **2.5.1. Medición de Parámetros Físicos Químicos**

Los parámetros físicos químicos que se evaluaron para caracterizar la bromelina cruda seca fueron humedad, actividad

de agua y pH. Se midió humedad para conocer la cantidad de agua disponible en base seca en bromelina cruda seca, actividad de agua para determinar la cantidad de agua disponible en bromelina cruda seca que favorece las reacciones de deterioro y el pH para saber si la bromelina cruda seca es acida o alcalina.

#### **2.5.1.1. Humedad**

El porcentaje de humedad se calculó mediante el uso de la termobalanza en el que se colocaron 5 gramos de muestra. Se procedió a programar el equipo y se anotaron los resultados presentados cuando el valor se hizo constante.

#### **2.5.1.2. Actividad de Agua**

El parámetro de aw se determinó en el equipo Aqua Lab a 25°C, en el cual se colocó 1 g de muestra y se hizo la lectura en el equipo que previamente se había calibrado.

### **2.5.1.3. pH**

Se tomaron 10 g de muestra de bromelina de tallo cruda seca y se disolvieron en 15 ml de agua destilada para proceder a tomar lectura de los valores mostrados en el pHmetro.

### **2.5.2. Determinación de la Cantidad de Proteínas**

El método seleccionado para la determinación de proteínas es el método de la reacción de Biuret, un método colorimétrico que se basa en la formación de un complejo coloreado entre el ion cúprico,  $\text{Cu}^{2+}$ , y los grupos NH de los enlaces peptídicos en medio básico con aparición de una coloración violeta-púrpura (12).

#### **2.5.2.1. Materiales, Reactivos y Equipos**

##### **Materiales**

- Pipetas aforadas
- Tubos de ensayo
- Gradilla
- Agua destilada
- Cubetas de plástico de 3 ml

### Reactivos

- Reactivo de Biuret

### Equipos

- Agitatuos
- Baño de agua termostático a 37°C
- Espectrofotómetro



FIGURA 2.5 Espectrofotómetro  
Elaborado por: John Magallanes – Nancy Salcedo,  
2013

#### 2.5.2.2. Metodología

Para conocer la concentración de proteína de bromelina cruda seca se tuvo primero que obtener la recta de calibración de la reacción de Biuret como se indica en el Anexo A.

Una vez obtenida la recta de calibración se procede a seguir el mismo procedimiento descrito en el Anexo A pero tomando 2 mL de la enzima. Para preparar la enzima se sigue el procedimiento descrito en el Anexo B.

### **2.5.3. Determinación de la Actividad Proteolítica**

El método seleccionado es el método analítico para la unidad de digestión de gelatina GDU que se define como la cantidad de enzima que libera 1mg de nitrógeno amino de una solución estándar de gelatina a pH 4.5 o 5.5 después de 20 minutos de digestión a 45°C (14). El método se fundamenta en la capacidad que tiene la bromelina en hidrolizar la gelatina a temperaturas y pH establecidos.

#### **2.5.3.1. Materiales y Reactivos**

##### **Materiales**

- Potenciómetro
- Balanza analítica
- Matraces aforados
- Pipetas aforadas

- Cronómetro
- Bureta
- Campana de seguridad
- Micropipetas
- Vasos precipitados
- Probetas
- Baño de agua a temperatura constante de 45.0°



FIGURA 2.6 Baño de Agua Termostatzado  
Elaborado por: John Magallanes – Nancy Salcedo,  
2013

### Reactivos

- Hidróxido de sodio 0.1N
- Gelatina mikrobiologie
- Ácido clorhídrico 0.1N
- Cloruro de sodio
- Ácido acético glacial
- Ácido clorhídrico 0.2N

- Peróxido de hidrogeno al 30%
- Formaldehido

#### **2.5.3.2. Metodología**

El procedimiento se lo detalla paso a paso en el Anexo B.

### **2.6. Diseño Experimental**

#### **2.6.1. Planteamiento del Problema**

La operación de secado del extracto de bromelina cruda tiene como consecuencia la disminución de la actividad proteolítica. Para preservar la actividad proteolítica de la enzima y reducir el efecto de operación de secado se ha desarrollado un diseño experimental basado en la utilización de agentes microencapsulantes y protectores.

#### **2.6.2. Selección del Modelo**

Se procedió a realizar un diseño experimental  $2^2$  con 3 repeticiones, donde 2 es el número de factores que fueron combinados con cada uno de los 2 niveles que posiblemente afectan a la variable de respuesta.



### 2.6.2.1. Variables del Experimento

El experimento posee las siguientes variables:

Variable dependiente o respuesta:

- la actividad proteolítica.

Variables independientes o factores:

- Factor A: Microencapsulante

Nivel bajo: Adición de Goma arábica

Nivel alto: Adición de Maltodextrina

- Factor B: Agente protector

Nivel bajo: Ausencia de sulfato de zinc

Nivel alto: Adición de sulfato de zinc

### 2.6.3. Hipótesis

Las hipótesis a probar para los efectos principales en este experimento son las siguientes:

H<sub>0</sub>: El agente protector no influye significativamente en la actividad proteolítica de la enzima.

H<sub>1</sub>: El agente protector influye significativamente en la actividad proteolítica de la enzima.

H<sub>0</sub>: El tipo de micro encapsulante no influye significativamente en la actividad proteolítica de la enzima.

$H_1$ : El tipo de micro encapsulante influye significativamente en la actividad proteolítica de la enzima.

Las hipótesis a probar para la interacción son:

$H_0$ : El agente protector y el tipo de micro encapsulante no influyen significativamente en la actividad proteolítica de la enzima.

$H_1$ : El agente protector y el tipo de micro encapsulante influyen significativamente en la actividad proteolítica de la enzima.

# **CAPÍTULO 3**

## **3. ANÁLISIS Y RESULTADOS**

### **3.1. Análisis Estadístico de Resultados**

#### **3.1.1. Pruebas para Extractos de Bromelina Cruda**

Una vez obtenidos los extractos de la cáscara y tallo de piña variedad “perolera” por el método ya descrito en el numeral 2.2 se caracterizó y determinó la actividad proteolítica por separado de los extractos.

##### **3.1.1.1. Caracterización y Rendimientos**

###### **Caracterización**

En la TABLA 3 se muestra los valores de los parámetros químicos de los extractos obtenidos a partir de piña “perolera”.

TABLA 3

**Parámetros Químicos del extracto crudo de piña**

Extracto	Parámetros químicos	
	pH	°Brix
<b>Cáscara</b>	4,2	5,4
<b>Tallo</b>	4,5	5,8

Elaborado por: John Magallanes – Nancy Salcedo, 2013

Se puede observar que los extractos de cáscara y tallo son ligeramente ácidos ya que poseen un pH de 4,2 y 4,5 respectivamente, encontrándose estos valores dentro del rango de pH 4 - 9 en donde el extracto enzimático es más estable (14).

**Rendimiento**

El preparado enzimático obtenido presenta un rendimiento en masa de 650 g de extracto crudo/kg de tallo y 312,5 g de extracto crudo/kg de cáscara.

**3.1.1.2. Actividad Proteolítica**

Con los registros del volumen usado en la titulación de la solución prueba y la solución blanco siguiendo el

procedimiento descrito en el Anexo A se obtienen los valores de T (Solución prueba) y B (Blanco) respectivamente, mostrados en la TABLA 4, que son usados para la determinación de la actividad proteolítica de la bromelina.

**TABLA 4**

**Volumen de la titulación de la solución blanco y solución prueba de los extractos crudos de piña**

Extracto			
Tallo		Cáscara	
B	T	B	T
5,8	6,6	5,7	6,3
	6,5		6,2
	6,3		6,1
	6,4		6,2
	6,5		6,0
	6,3		6,2
	6,5		6,1
	6,4		6,2

Elaborado por: John Magallanes – Nancy Salcedo, 2013

Los valores mostrados en la TABLA 4 son reemplazados en la ecuación mostrada a continuación y que fue explicada con detalle en el Anexo B.

$$GDU/g = \frac{(T - B) \times 14 \times N \times 50}{Wt(g)} \quad Ec. 1$$

Resolviendo la ecuación Ec.1 se obtienen los valores de actividad proteolítica:

**TABLA 5**

**Actividad proteolítica de cada extracto de piña**

<b>Actividad proteolítica (GDU/g)</b>		
<b>No. De muestras</b>	<b>Tallo</b>	<b>Cáscara</b>
1	1120	840
2	980	700
3	700	560
4	840	700
5	980	420
6	700	700
7	980	560
8	840	700

Elaborado por: John Magallanes – Nancy Salcedo, 2013

La actividad proteolítica promedio del extracto de bromelina cruda de tallo es 893 GDU/g y del extracto de bromelina cruda de cascara es 648GDU/g.

**Análisis Estadístico**

Los valores de actividad proteolítica que se muestran en la TABLA 5 se consideraron para ser analizados mediante el uso del programa estadístico Minitab 16, y

así, determinar la mejor actividad proteolítica entre los extractos obtenidos a partir de la cáscara y el tallo de piña variedad “perolera”.

Para realizar la comparación primero se comprobó que los datos de la población siguieron una Distribución Normal, para lo cual se realizó una prueba de hipótesis a los valores obtenidos de actividad proteolítica de cada extracto. Las hipótesis planteadas fueron las siguientes:

$H_0$ : Los datos siguen una distribución normal

$H_1$ : Los datos no siguen una distribución normal

Las siguientes gráficas nos muestran la distribución de la actividad proteolítica en GDU/g de cada extracto.

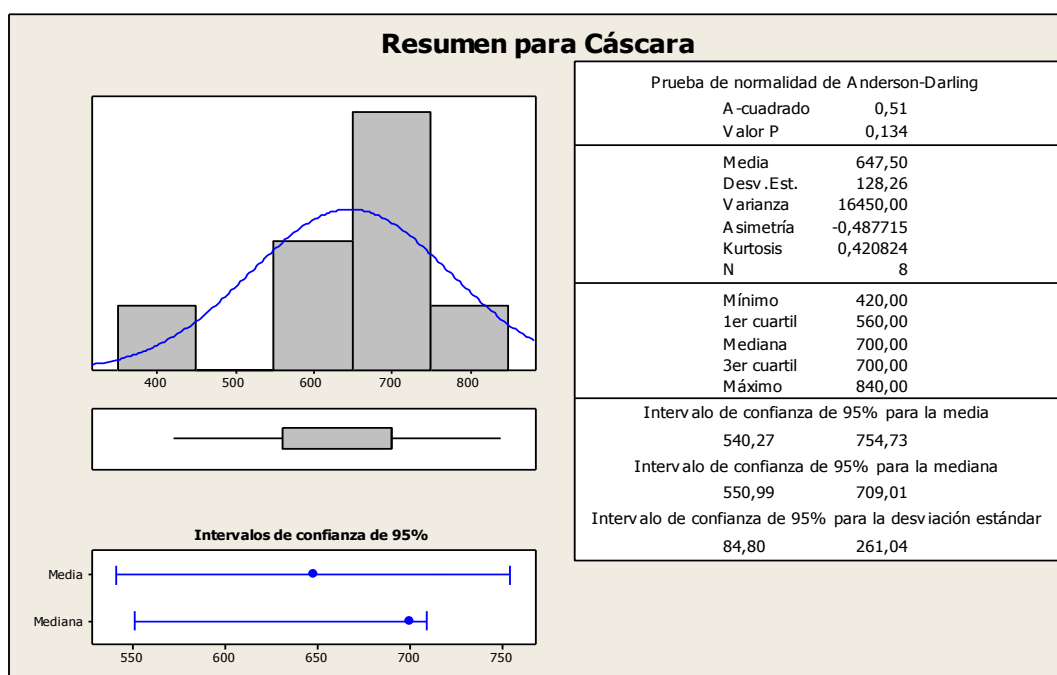
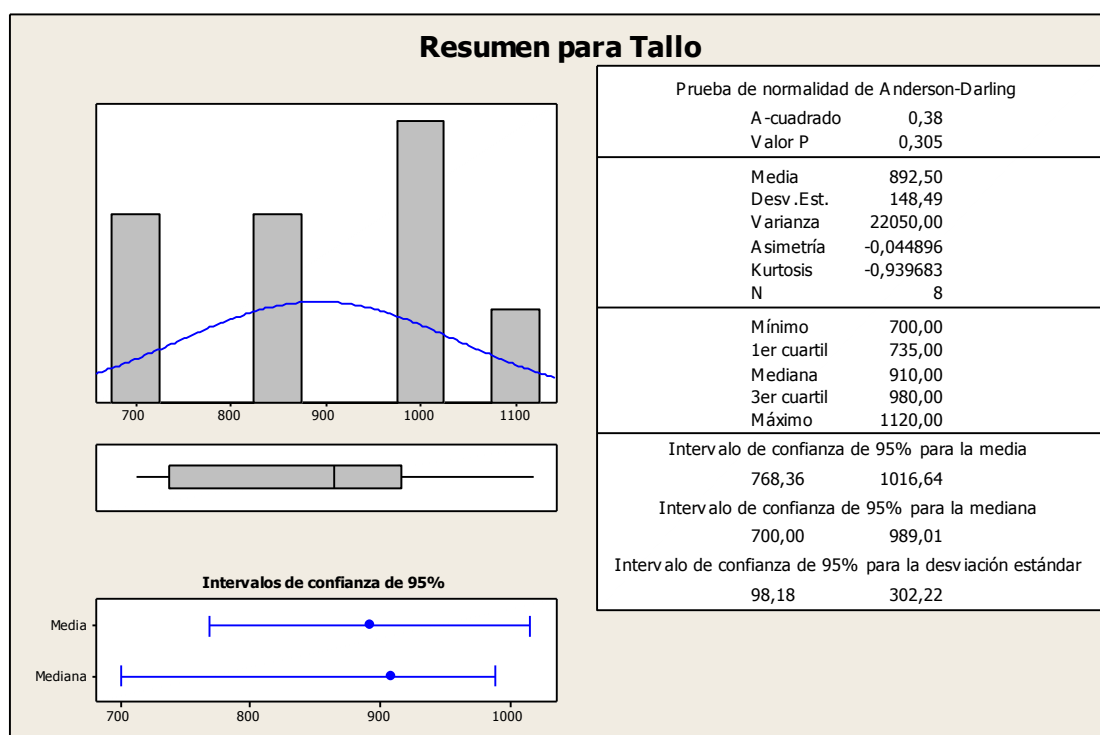


FIGURA 3.1 Estadística Descriptiva del Extracto de bromelina Cruda de  
Cáscara de Piña  
Fuente: Minitab 16

Con el valor p mostrado en la FIGURA 3.1 igual a 0,134, no existe evidencia estadística para rechazar  $H_0$ , por lo tanto los datos de la actividad proteolítica del extracto de bromelina cruda de cáscara siguen una distribución normal.





**FIGURA 3.2 Estadística Descriptiva del Extracto de Bromelina Cruda de Tallo de Piña**  
Fuente: Minitab 16

Con el valor p mostrado en la FIGURA 3.2 igual a 0,305, no existe evidencia estadística para rechazar  $H_0$ , por lo tanto los datos de la actividad enzimática del extracto de bromelina cruda de tallo siguen una distribución normal.

Comprobado que los datos de las dos poblaciones siguen una Distribución Normal se determinará si

existen diferencias significativas entre las medias de los extractos de bromelina cruda de cáscara y tallo para así conocer cuál es el residuo que posee la mejor actividad proteolítica.

Para ello, se plantearon las siguientes pruebas de hipótesis:

$H_0$ : Las medias de los extractos de bromelina cruda de cáscara y tallo de piña son iguales

$H_1$ : Las medias de los extractos de bromelina cruda de cascara y tallo no son iguales

Mediante el programa estadístico Minitab 16 se obtuvieron los siguientes resultados:

### Prueba T e IC de dos muestras: Tallo; Cáscara

T de dos muestras para Tallo vs. Cáscara

	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
Tallo	8	893	148	52
Cáscara	8	647	128	45

Diferencia =  $\mu$  (Tallo) -  $\mu$  (Cáscara)

Estimado de la diferencia: 245,0

IC de 95% para la diferencia: (95,1; 394,9)

Prueba T de diferencia = 0 (vs. no =): Valor T = 3,53

Valor P = 0,004 GL = 13

FIGURA 3.3 Estadística Descriptiva del Extracto crudo de cascara de Piña  
Fuente: Minitab 16

Con el valor p igual a 0,004 mostrado en la FIGURA 3.3, existe evidencia estadística para rechazar  $H_0$  y aceptar  $H_1$ , por lo tanto, las medias de los extractos de bromelina cruda de cáscara y tallo de piña no son iguales.

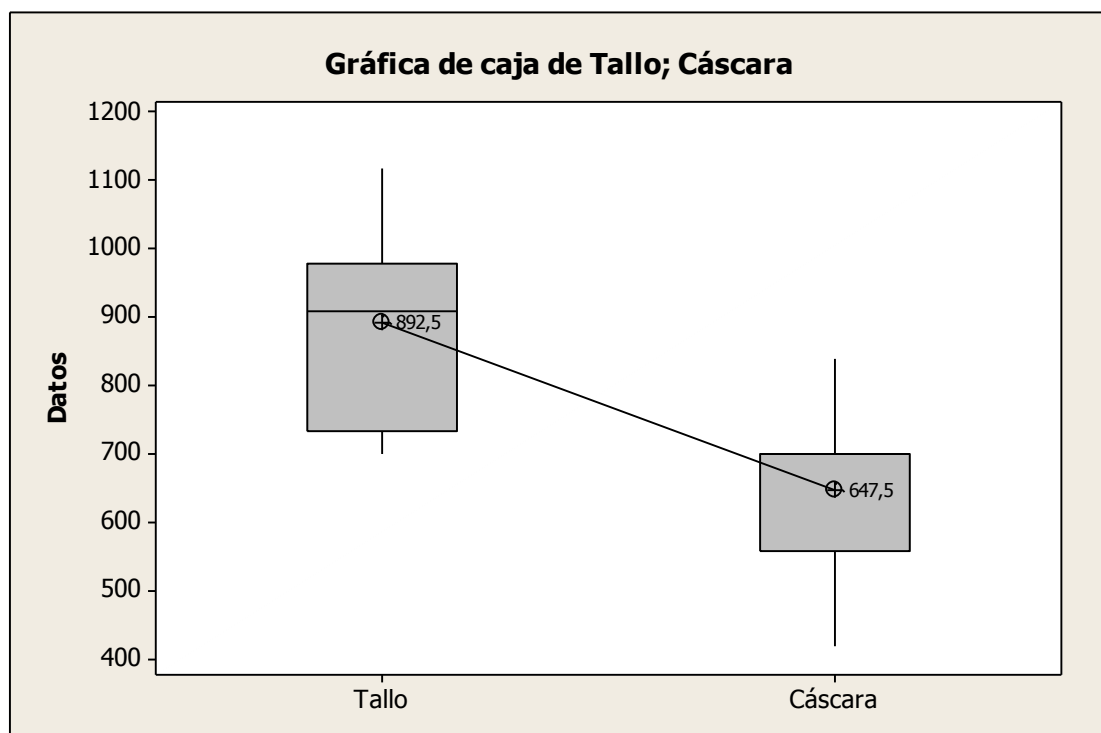


FIGURA 3.4 Gráfica de Cajas para la Diferencia de Medias entre los Extractos Crudos de Tallo y Cáscara de Piña  
Fuente: Minitab 16

Además, con el diagrama de cajas ilustrado en la FIGURA 3.4 una vez más se puede evidenciar que existen diferencias entre las medias de los extractos, ya que la media del extracto de bromelina cruda de cáscara posee una actividad proteolítica de 648 GDU/g y la media del extracto de tallo de piña una actividad de 893 GDU/g.

No existen estudios comparativos de actividades proteolíticas de extractos de bromelina cruda obtenidos a partir de residuos de piña “Perolera”.

El instituto de ciencias farmacéuticas y el departamento farmacéutico de la India realizaron un estudio comparativo de extracción y purificación de bromelina de tallo y fruto de la planta de piña en el cual indicaron que la bromelina de tallo cruda posee una mayor actividad proteolítica hidrolizando Gelatina que la bromelina de fruto cruda (17).

En la tabla a continuación se muestra los valores resumidos obtenidos durante su estudio.

**TABLA 6**  
**Actividades proteolíticas del Estudio Realizado en**  
**India**

<b>Muestra</b>	<b>Actividad proteolítica GDU/g</b>
Bromelina de tallo cruda	2100 +/- 340
Bromelina de fruto cruda	1450 +/- 450

Fuente: GAUTAM S; *et. al*, 2010

Al igual que el estudio comparativo de extracción y purificación de bromelina de tallo y fruto de la planta de piña, nuestra bromelina cruda de tallo presento mayor actividad proteolítica que la bromelina cruda de cascara, considerando la cascara como parte del fruto. Sin embargo los valores de actividades proteolíticas fueron bajos comparados con el estudio realizado en la India a pesar de que se habían realizado centrifugaciones durante la extracción, ya que en el estudio con el que se compara nuestro trabajo concluyeron que la actividad enzimática aumenta tras esta operación.

Cabe recalcar que los datos de otras experimentaciones han sido obtenidos de otras variedades de piña y utilizando diferentes métodos de extracción.

Por lo tanto en base a los resultados de los ensayos realizados la bromelina cruda de tallo obtenida de piña Perolera posee mayor actividad proteolítica que la bromelina cruda de cascara obtenida de piña Perolera.

### **3.1.2. Pruebas para Bromelina Cruda Seca**

El extracto de bromelina cruda de tallo con mejor actividad proteolítica fue seleccionado, micro encapsulado y secado por aspersión, para luego ser caracterizado y medida su actividad proteolítica.

Debido a la operación de secado y a la sensibilidad de la bromelina a altas temperaturas se seleccionó como agente micro encapsulante la goma arábica ya que es un polisacárido que funciona como agente para producir capsulas lábiles a altas temperaturas y protegidas de otros factores como la humedad, lo que permite brindarle protección a la actividad proteolítica de la enzima ante altas temperaturas.

#### **3.1.2.1. Caracterización y Rendimientos**

##### **Caracterización**

En la TABLA 7 se muestra los parámetros físicos químicos de la bromelina cruda seca obtenida tras secar por aspersión.

**TABLA 7**  
**Parámetros Físicos Químicos de Bromelina Cruda**  
**Seca de Tallo**

<b>Parámetros</b>	<b>Resultados</b>
Humedad (%)	10.9
Aw	0,54
pH	3,981

Elaborado por: John Magallanes – Nancy Salcedo,  
2013

Con los valores de la TABLA 7 se puede evidenciar el resultado de un polvo con un valor bajo de actividad de agua y de humedad; similar al de enzimas comerciales, lo que se resume en un producto con buena estabilidad ante factores de deterioro como la humedad del ambiente y altos valores de actividades de agua en donde muchos microorganismos son capaces de reproducirse. Además el polvo presenta aun la característica de tener un pH dentro del rango de 4 a 8 en que la enzima es estable (14).

### **Concentración de Proteínas**

Al realizar la preparación de la enzima como lo indica el procedimiento del Anexo B, la bromelina se diluyo en



una proporción de 1:1000, ya que se añaden 0,05 g de enzima en 50 mL de una solución constituida por 8,3 mL de solución buffer y 41,7 mL de agua destilada con un pH de 4,5. Los resultados obtenidos de la recta de calibración serán multiplicados por el factor de dilución, en este caso será el inverso de la proporción. La concentración de proteínas en bromelina cruda seca de tallo fue de 40,6 mg/mL.

### **Rendimiento**

El rendimiento del proceso de extracción, caracterización y secado por aspersión de bromelina cruda seca de tallo es de 171 g / kg de piña.

#### **3.1.2.2. Actividad Proteolítica**

Siguiendo el procedimiento descrito en el Anexo B se obtuvo los valores de T (titulación) y B (blanco) mostrados a continuación:

**TABLA 8**

**Volumen de la Titulación de la Solución Blanco y Solución Prueba de Bromelina Cruda Seca de Tallo**

<b>Bromelina Cruda Seca</b>	
<b>B</b>	<b>T</b>
6,0	6,3
	6,4
	6,1
	6,2
	6,3
	6,4
	6,3
	6,3

Elaborado por: John Magallanes – Nancy Salcedo,  
2013

Los datos obtenidos y mostrados en la TABLA 8 son reemplazados en la Ec. 1 para obtener los valores de la actividad proteolítica de bromelina cruda seca que se muestran en la TABLA 9.

**TABLA 9****Actividad Proteolítica de Bromelina Cruda**

<b>No. de muestras</b>	<b>Bromelina Cruda Seca (GDU/g)</b>
1	420
2	560
3	140
4	280
5	420
6	560
7	420
8	420

Elaborado por: John Magallanes – Nancy Salcedo,  
2013

La actividad proteolítica promedio de bromelina cruda seca de tallo es 403,0 GDU/g.

### **3.1.3. Análisis de Diferencias Significativas entre Actividades Proteolíticas de Extracto y Bromelina Cruda Seca**

Para conocer cuál es el efecto del proceso de secado en la actividad proteolítica de la enzima se realizó una prueba de hipótesis que indique si existen diferencias significativas entre las medias de las actividades proteolíticas del extracto de bromelina cruda de tallo y la bromelina cruda seca de tallo.

Primero se determinó si los datos de poblaciones de extracto crudo y bromelina cruda seca de tallo siguen una Distribución Normal, para ello se estableció las siguientes hipótesis:

$H_0$ : Los datos siguen una distribución normal

$H_1$ : Los datos no siguen una distribución normal

Con la ayuda del programa estadístico Minitab 16 se obtuvo las siguientes gráficas de resultados:

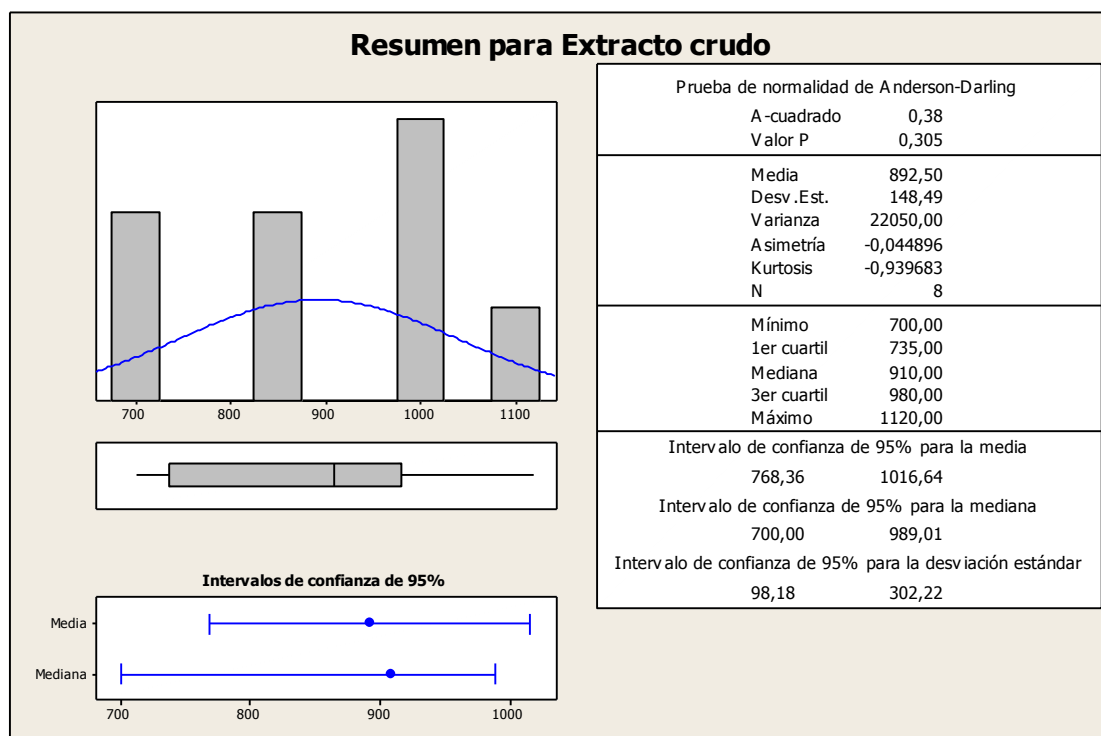


FIGURA 3.5 Estadística Descriptiva de extracto Bromelina Cruda de Tallo  
Fuente: Minitab 16

Con un valor p de 0,305 mostrado en la FIGURA 3.5, existe evidencia estadística para no rechazar  $H_0$ , por lo tanto los datos del extracto crudo de bromelina sigue una distribución normal. La actividad proteolítica promedio del extracto de bromelina cruda de tallo es 893 GDU/g.

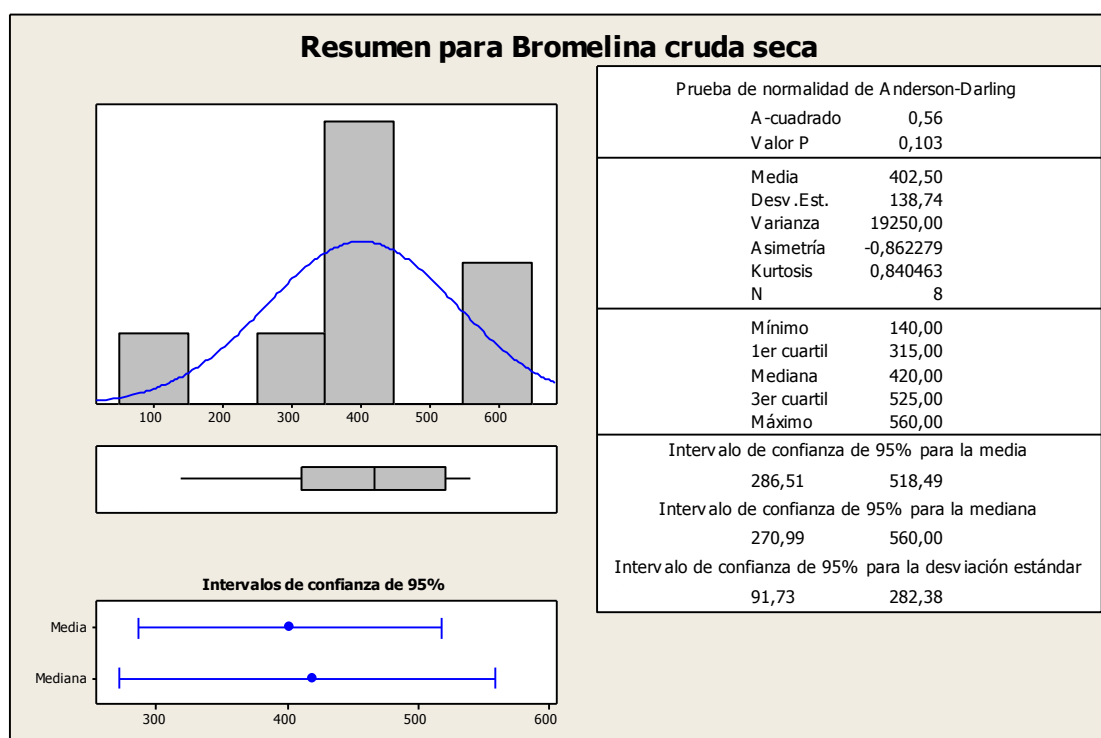


FIGURA 3.6 Estadística Descriptiva de Bromelina Cruda seca de Tallo  
Fuente: Minitab 16

Con un valor p de 0,103 mostrado en la FIGURA 3.6, existe evidencia estadística para no se rechazar  $H_0$ , por lo tanto los datos de la bromelina cruda seca de tallo siguen una distribución normal.

Una vez que se comprobó la normalidad de las dos poblaciones se realizó la siguiente prueba de hipótesis:

$H_0$ : Las medias del extracto crudo antes y después de ser sometido al proceso de secado son iguales

$H_1$ : Las medias del extracto antes y después del proceso de secado no son iguales

Las gráficas siguientes muestran los resultados obtenidos del programa estadístico Minitab 16:

<b>Prueba T e IC de dos muestras: Extracto crudo; Bromelina cruda seca</b>				
T de dos muestras para Extracto crudo vs. Bromelina cruda seca				
				Error estándar de la media
	N	Media	Desv.Est.	
Extracto crudo	8	893	148	52
Bromelina cruda seca	8	402	139	49
Diferencia = $\mu$ (Extracto crudo) - $\mu$ (Bromelina cruda seca)				
Estimado de la diferencia: 490,0				
IC de 95% para la diferencia: (334,8; 645,2)				
Prueba T de diferencia = 0 (vs. no =): Valor T = 6,82 Valor P = 0,000 GL = 13				

**FIGURA 3.7 Prueba t para la Diferencia de Medias entre el Extracto Crudo y Bromelina Cruda Seca de Tallo de Piña**  
Fuente: Minitab 16

Con el valor p de 0.000 mostrado en la FIGURA 3.7, existe evidencia estadística para rechazar  $H_0$ , por lo tanto las medias

del extracto de bromelina cruda de tallo y bromelina cruda seca de tallo no son iguales.

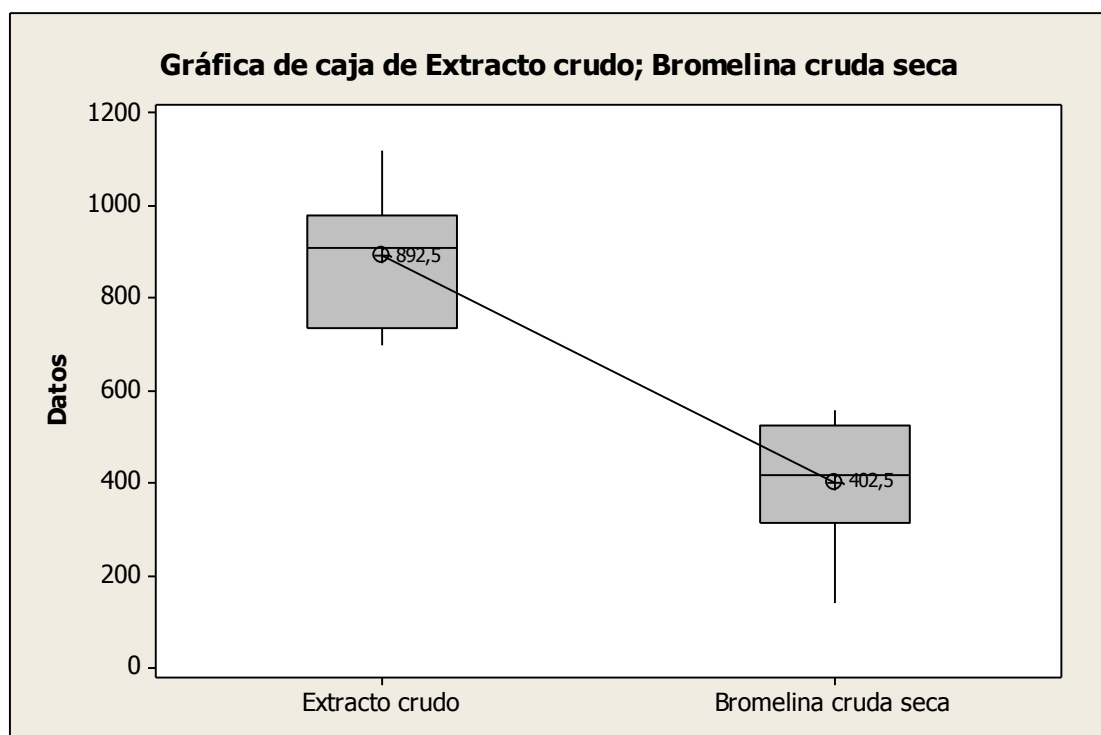


FIGURA 3.8 Gráfica de Cajas para la Diferencia de Medias entre el Extracto de Bromelina Cruda y Bromelina Cruda Seca de Tallo de Piña  
Fuente: Minitab 16

Se puede evidenciar en el diagrama de cajas ilustrado en la FIGURA 3.8 la diferencia que existe en la media de la actividad proteolítica del extracto crudo de bromelina siendo este; 893GDU/g y la media de la actividad proteolítica de la bromelina cruda seca de tallo es de tan solo 403,0 GDU/g.

De los datos obtenidos podemos evidenciar que el extracto de bromelina cruda de tallo posee mayor actividad proteolítica debido a que la enzima aún no ha sido expuesta a temperaturas de secado y por ende no se ha iniciado su desnaturalización por efecto del calor. A diferencia de la bromelina cruda seca de tallo se puede notar como el secado ha tenido efecto sobre el valor de la actividad proteolítica, disminuyéndolo a pesar de micro encapsular con goma arábica para reducir la sensibilidad de la enzima a altas temperaturas como en parte lo realizó el Ing. Luis Alberto Reyes Nava en su estudio de “Optimización y caracterización de la micro encapsulación de la proteasa hemisfericina refinada” con el uso de goma arábica al 10% utilizando temperaturas de secado superiores a las de nuestro estudio (18).

Por lo tanto no es suficiente utilizar un agente microencapsulante para proteger la actividad proteolítica de la bromelina de agentes desfavorables de la variable estudio, sobre todo de las temperaturas de secado por aspersión. Cabe indicar que existen pocos estudios acerca de bromelina cruda de tallo secada por aspersión ya que todos han sido realizados usando métodos de secado al vacío o de liofilización en donde



la temperatura es un factor descartable y por ende favorable para la obtención de un polvo de bromelina con una actividad proteolítica protegida.

### **3.2. Análisis Estadístico del Diseño de Experimento**

Debido a los resultados obtenidos anteriormente y tras evidenciar que el proceso de secado tiene un efecto negativo sobre la actividad proteolítica de la enzima se procedió a realizar el siguiente diseño de experimento. El extracto de bromelina cruda de tallo fue secado con un agente protector de la actividad proteolítica y un tipo de micro encapsulante adicional, obteniendo así cuatro lotes:

- Bromelina cruda seca sin agente protector micro encapsulada con goma arábica
- Bromelina cruda seca con agente protector micro encapsulada con goma arábica
- Bromelina cruda seca sin agente protector micro encapsulada con maltodextrina
- Bromelina cruda seca con agente protector micro encapsulada con maltodextrina

## Objetivos

- Comprobar si el tipo de microencapsulante influye sobre la actividad proteolítica de la enzima tras la operación de secado.
- Comprobar si el agente protector influye sobre la actividad proteolítica de la enzima tras la operación de secado.

### 3.2.1. Datos y Resultados Obtenidos

Se realizó la medición de la actividad proteolítica de los cuatro lotes de bromelina cruda seca por el procedimiento descrito en el Anexo B. La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos:

**TABLA 10**

#### **Actividad proteolítica de Bromelina Cruda Seca de Tallo**

	<b>Goma Arábica</b>	<b>Maltodextrina</b>
<b>Sin Agente Protector</b>	420	280
	560	420
	140	140
<b>Con Agente Protector</b>	980	700
	1120	980
	840	840

Elaborado por: John Magallanes – Nancy Salcedo, 2013

### 3.2.2. ANOVA

Para cada prueba de hipótesis planteada en el numeral 2.6.3 se obtuvo un valor p, como muestra el análisis de ANOVA de dos factores ilustrado en la siguiente figura:

<b>ANOVA de dos factores: Actividad proteo vs. Agente Protector; Tipo de Microencapsulante</b>					
Fuente	GL	SC	MC	F	P
Agente Protector	1	1020833	1020833	39,06	0,000
Tipo de Microencapsulante	1	40833	40833	1,56	0,247
Interacción	1	1633	1633	0,06	0,809
Error	8	209067	26133		
Total	11	1272367			

S = 161,7    R-cuad. = 83,57%    R-cuad. (ajustado) = 77,41%

FIGURA 3.9 Anova de dos factores para Bromelina Cruda Seca de Tallo  
Fuente: Minitab 16

#### **Análisis para los efectos principales:**

Con un valor p de 0,000 mostrado en la FIGURA 3.9, existe evidencia estadística para rechazar  $H_0$ , por lo tanto el agente protector influye significativamente en la actividad proteolítica de la bromelina cruda seca de tallo

Con un valor p de 0,247 mostrado en la FIGURA 3.9, no existe evidencia estadística para rechazar  $H_0$ , por lo tanto el tipo de

microencapsulante no influye significativamente en la actividad proteolítica de la enzima.

### Análisis para la interacción:

Con un valor p de 0,809 mostrado en la FIGURA 3.9, no existe evidencia estadística para rechazar  $H_0$ , por lo tanto el agente protector y el tipo de micro encapsulante no influyen significativamente en la actividad proteolítica de la enzima.

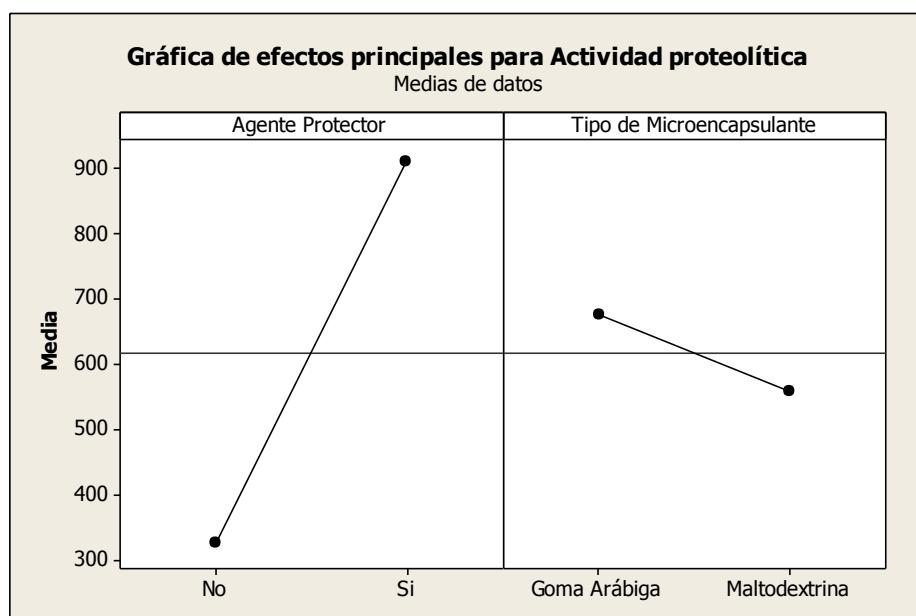


FIGURA 3.10 Grafica de Efectos Principales para la Actividad Proteolítica de la Enzima

Fuente: Minitab 16

La FIGURA 3.10 nos indica que no existe mucha diferencia en usar goma arábica o maltodextrina para obtener una enzima con mayor actividad proteolítica protegida y como el agente protector influye significativamente sobre la actividad proteolítica.

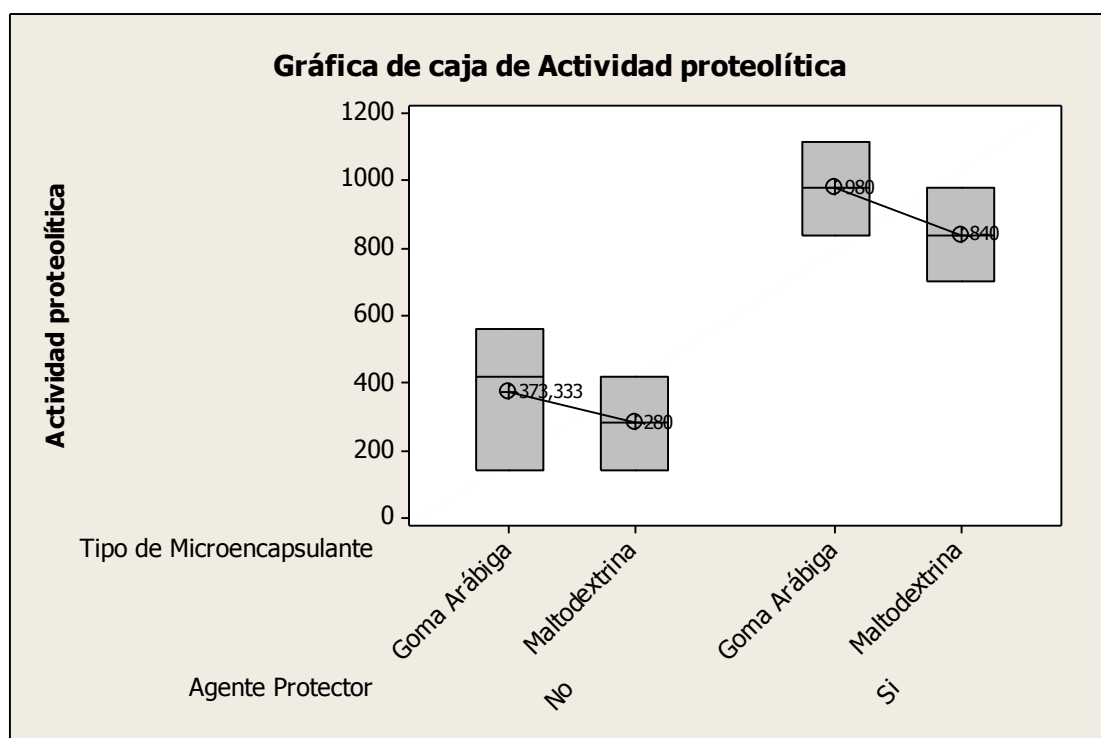


FIGURA 3.11 Gráfica de Cajas de Actividad Proteolítica Resultante de Combinar el Agente Microencapsulante y el Agente Protector  
Fuente: Minitab 16

La FIGURA 3.11 detalla como las muestras micro encapsuladas con goma arábica combinada con el agente microencapsulante

dieron mejores resultados en la actividad proteolítica de la enzima a diferencia de la micro encapsular con maltodextrina en donde los porcentajes de concentración de microencapsulantes y agentes protectores para cada lote no variaron.

### **3.2.3. Discusión**

En el diseño de experimental realizado se pudo constatar que la goma arábica frente a la maltodextrina tiene un mayor efecto pero no lo suficiente para proteger la actividad proteolítica de la enzima de las temperaturas de secado ya que los valores obtenidos fueron de 373 GDU/g para bromelina cruda seca micro encapsulada con goma arábica y 280 GDU/g para bromelina cruda seca micro encapsulada con maltodextrina. Cabe indicar que los microencapsulantes utilizados en procesos de secado por aspersión brindan protección también de otros factores como; la humedad y la oxidación quienes influyen sobre la actividad proteolítica de la enzima.

Para la protección de la actividad proteolítica de la enzima es necesario el uso de aditivos con funciones protectoras como es el caso del sulfato de zinc en donde durante la experimentación

se obtuvieron valores de actividades proteolíticas de 980 GDU/g para bromelina cruda seca micro encapsulada con goma arábica y sulfato de zinc y 840 GDU/g para bromelina cruda seca micro encapsulada con maltodextrina y sulfato de zinc.

En resumen, al concluir el diseño experimental se demostró que el uso de un agente microencapsulante combinado con una sal como aditivos son factores que influyen en la actividad proteolítica y que se deben considerar y controlar para la obtención de una enzima con actividad proteolítica protegida tras la operación de secado por aspersión.

# CAPÍTULO 4

## 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### CONCLUSIONES

- La piña de variedad Perolera es un fruto de cuyos residuos se pueden obtener extractos de enzimas como la bromelina con altos valores de actividad proteolítica siendo estos mayores en el tallo que en la cascara del fruto, con pH ligeramente ácidos que se localizan dentro de los valores de estabilidad de la enzima. Se comprobó mediante la extracción con un buffer que detalla la patente cubana que el extracto de bromelina cruda de tallo presentaba mayor actividad proteolítica con un promedio de 893 GDU/g y el extracto de bromelina cruda de cáscara una actividad proteolítica promedio de 648 GDU/g.



- El proceso de secado por aspersión del extracto de bromelina cruda de tallo tiene efectos negativos sobre la actividad proteolítica de la enzima, ya que disminuye por efecto del calor aun así cuando esta ha sido sometida a temperaturas de secado de 65°C. Se demostró que el extracto de bromelina cruda de tallo antes de secar por aspersión presentaba una actividad proteolítica equivalente a 893 GDU/g y tras secarla su actividad proteolítica disminuyó a 403 GDU/g.
- Micro encapsular con goma arábica a una concentración del 15% del volumen total del extracto de bromelina cruda de tallo y secar por aspersión a una temperatura de entrada de 65°C y 50°C de salida se obtiene un polvo de bromelina cruda seca con humedad promedio del 10.9%, actividad de agua de 0.54 y un pH de 3.98 en el que la enzima se encuentra dentro del rango de estabilidad. El rendimiento del proceso de extracción, caracterización y secado por aspersión de bromelina cruda seca de tallo es de 171 g / kg de piña
- Los resultados de la experimentación mostró valores promedios más altos de actividad proteolítica de bromelina de tallo cruda seca micro encapsulado con goma arábica, 3733 GDU/g, a diferencia de los obtenidos con maltodextrina, 280 GDU/g. Sin embargo los valores de

actividad proteolítica obtenidos son bajos e indican el poco efecto que tiene los agentes microencapsulantes durante el secado.

- El uso de agentes micro encapsulantes y de agentes protectores como el sulfato de zinc, es una buena opción para obtener bromelina de tallo cruda seca con una actividad proteolítica protegida tras operaciones de secado por aspersión. Al realizar la experimentación se obtuvo una mayor actividad proteolítica de 980 GDU/g para la bromelina de tallo cruda seca micro encapsulada con goma arábica y una actividad proteolítica de 840 GDU/g para la bromelina cruda seca micro encapsulada con maltodextrina, lo que afirma que con el uso de goma arábica y sulfato de zinc se puede obtener una enzima con mayor actividad proteolítica protegida.

## **RECOMENDACIONES**

- Se recomienda hacer un estudio acerca del grado de madurez de la piña variedad Perolera en que se pueda extraer y obtener mayores concentraciones de bromelina cruda.
- Sería recomendable realizar estudios acerca de otros tipos de extracciones y secado de bromelina de piña de variedad Perolera,

para evaluar la actividad enzimática frente a la opción propuesta en el proyecto.

- Se recomienda hacer un estudio de purificación de bromelina de piña Perolera en donde posiblemente se pueda obtener una enzima pura con una mayor actividad proteolítica.
- Se propone que se implementen capacitaciones al sector agrícola acerca del manejo de los residuos post-cosecha y las ventajas económicas que pueden obtener de los residuos o desechos agrícolas.

## **ANEXOS**

## ANEXO A

### OBTENCIÓN DE LA RECTA DE CALIBRACIÓN DE LA REACCIÓN DE BIURET (12)

Para obtener los valores de absorbancia que serán graficados en la recta de calibración frente a los de la concentración de proteína se sigue el siguiente procedimiento:

- Se colocan en una gradilla ocho tubos de ensayo que deben de estar limpios y secos.
- Se numeran del 1 al 8 con un rotulador permanente al agua.
- Con las micropipetas adecuadas al volumen a medir, se adiciona a cada uno de ellos los volúmenes de la disolución patrón de albúmina de suero bovino (BSA) y de agua destilada que se indican en la siguiente

Tabla:

<b>Tubo (nº)</b>	<b>Albúmina patrón (mL)</b>	<b>Agua (mL)</b>
1	0	2,0
2	0,2	1,8
3	0,4	1,6
4	0,6	1,4
5	0,8	1,2
6	1,0	1,0
7	1,2	0,8
8	1,4	0,6

- Se agita bien cada uno de los tubos de ensayo con el agitator.
- A cada uno de los tubos de ensayo se añaden 3 mL de reactivo de Biuret.

- Se vuelven a agitar bien con el agitator cada uno de los tubos de ensayo.
- Se toma la gradilla con los tubos de ensayo y se introduce en el baño de agua termostático a 37°C, dejándose que se desarrolle el color durante 15 min.
- Se enfrían los tubos de ensayo, introduciendo la gradilla en agua a temperatura ambiente. Un par de minutos es suficiente.
- Se sacan los tubos del agua a temperatura ambiente y se procede a medir en el espectrofotómetro.
- Se ajusta el mando de selección de la longitud de onda del espectrofotómetro a 540 nm.
- Se ajusta el cero de absorbancia con la solución blanco exenta de proteína (tubo 1).
- Se miden las absorbancias de los tubos 2 a 8. Siempre que se realicen las medidas desde la solución menos concentrada (tubo 2) a la más concentrada (tubo 8), se cometerá el mismo error de medida, por lo que no será necesario enjuagar y secar la cubeta después de cada medición.
- Se anotan las medidas de absorbancia.
- Una vez realizadas las medidas, se limpia cada uno de los tubos de ensayo con escobilla y jabón. Se lava con abundante agua del grifo y se

enjuagan los tubos con agua destilada. Se dejan en la gradilla boca abajo para que se sequen.

Para calcular la concentración de proteína que se ha colocado en cada uno de los tubos de ensayo se tomará como ejemplo el tubo 2 en el que se han añadido 0,2 mL de BSA 10 mg/mL diluidos a un volumen de 2 mL con agua. Realizando el cálculo correspondiente se obtiene:

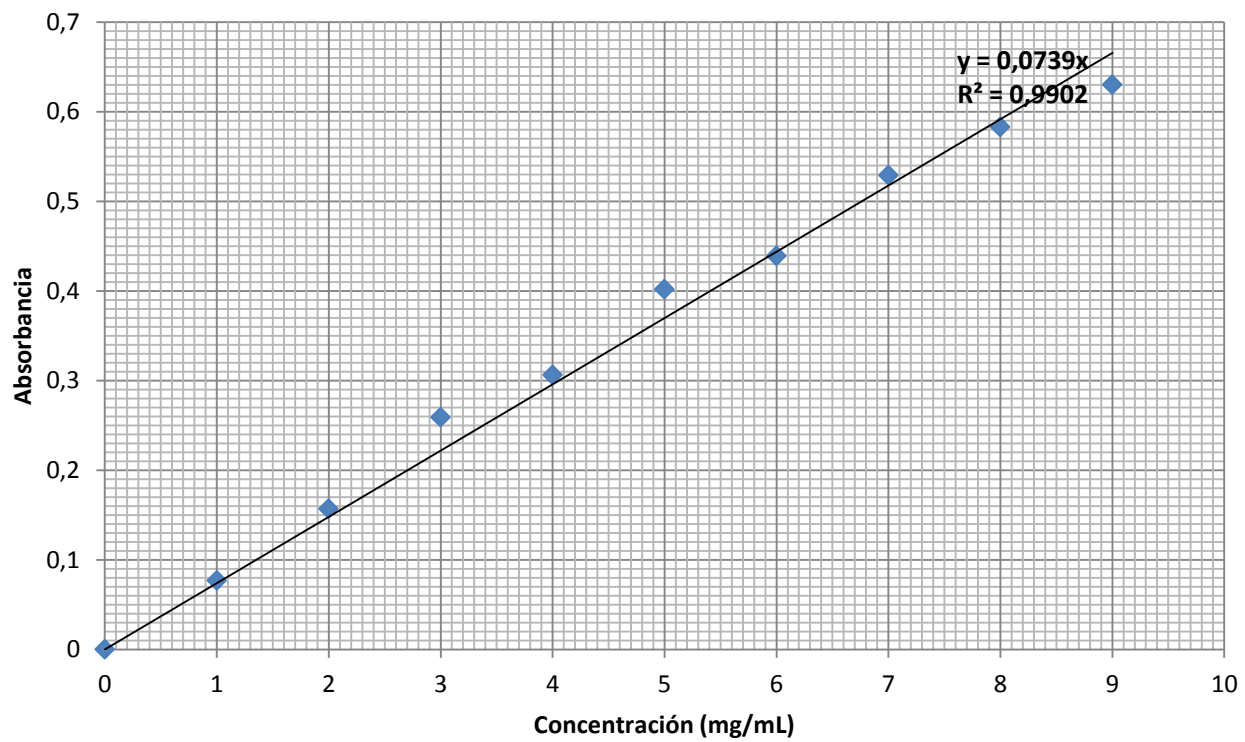
$$(0,2 \text{ mL} \times 10 \text{ mg/mL}) : 2 \text{ mL} = 1 \text{ mg/mL}$$

Los valores experimentales de absorbancia obtenidos para cada concentración de proteína estándar calculada de cada uno de los tubos se presentan a continuación.

<b>Concentración</b>	<b>Absorbancia</b>
0	0
1	0,077
2	0,157
3	0,259
4	0,306
5	0,402
6	0,439
7	0,529
8	0,583
9	0,63

Representando en una gráfica los valores obtenidos se obtiene la siguiente recta de calibración:

### Recta de Calibración





## ANEXO B

### MÉTODO ANALÍTICO PARA LA UNIDAD DE DIGESTIÓN DE LA GELATINA (GDU) (14)

#### Preparación de reactivos:

1. Agua destilada: aproximadamente 500 ml. Ajuste el pH a 4.5 con NaOH 0.1 N
2. Sustrato de gelatina:
  - 2.1 Disuelva 25 gramos de gelatina (*Mikrobiologie*, 1.04070) en 375 ml de agua caliente, hierva y enfríe a 45° C.
  - 2.2 Ajuste el pH a 4.5 con HCl 0.1 N y diluya a 500 ml en agua destilada.
  - 2.3 Mantenga la gelatina a 45° C.
3. Solución búfer:
  - 3.1 Añada lentamente 15 gramos de NaCl a 40-50 ml de agua en un vaso de precipitado de 150ml y agite hasta disolver.
  - 3.2 Agregue 0.570 ml de ácido acético.
  - 3.3 Ajuste el pH a 4.5 con HCl 0.2N (el volumen será de más de 100ml.)
4. Peróxido de hidrógeno al 3%:
  - 4.1 Transfiera 2.5 ml de peróxido de hidrógeno al 30% (solución madre) a un matraz aforado de 25 ml y diluya con agua destilada a un pH de 4.
5. Formaldehído al 37% pH 9.0:

5.1 Ajuste un volumen suficiente (100 ml) de formaldehído a un pH de 9.0 con NaOH 0.1N (se requieren de aproximadamente 20 ml de formaldehído por muestra antes de ajustar el pH).

6. NaOH 0.100 N (estándar comprado):

6.1 Solución madre estandarizada a 0.100 N.

### **Procedimiento:**

#### **1. Preparación de la enzima:**

a. Cálculo de la preparación de la enzima

Peso =  $100/\text{actividad blanco}$  (aproximadamente 0.05 g o 50 mg)

A. Pese la enzima y colóquela en un matraz aforado de 50 ml.

B. Añada 8.3 ml de la solución búfer.

b. Deje reposar por 30 minutos a temperatura ambiente.

c. Diluya a 50 ml usando agua destilada con un pH de 4.5, agregue una barra agitadora y agite por 10 o 15 minutos.

#### **2. Procedimiento de la enzima:**

a. Tome dos vasos de precipitado de 100 ml (uno para la solución prueba y el otro para el blanco), coloque una barra agitadora y transfiera 25 ml del sustrato de gelatina a cada uno de ellos. Póngalos en un baño de agua a 45° C por 5 minutos. Uno para la solución prueba y el otro para el blanco.

**Solución prueba:**

1. Añada 1.0 ml de solución de bromelina en el vaso de precipitado designado para la solución prueba, inicie el cronómetro y agite con movimientos circulares.
2. Después de exactamente 20 minutos de incubación a 45° C, agregue 0.1 ml de peróxido de hidrógeno al 3 % y agite con movimientos circulares.
3. Incube por 5 minutos adicionales.
4. Remueva el vaso de precipitado del baño de agua y agitándolo de modo constante inserte el electrodo del potenciómetro.
5. Registre el pH después de 10 segundos (pH inicial).
6. Ajuste el pH a 6.0 con NaOH 0.1 N (aproximadamente 2-4 ml).  
**Nota:** Tenga cuidado al ajustar el pH a 6.0; al llegar a 5.8 añada pequeñas cantidades muy lentamente ya que en este punto el NaOH incrementa rápidamente este parámetro.
7. Continúe agitando constantemente y agregue 10 ml de formaldehído al 37% pH 9.0.
8. Registre el pH después de 10 segundos y después de 1 minuto.
9. Titule a pH 9.0 con NaOH 0.1 N.
10. Registre el volumen usado en la titulación. Este es el valor de "T".

**Solución blanco:** La solución blanco deberá correrse junto con la solución de prueba. Para ello inicie la determinación de la solución blanco 12 minutos después de la solución prueba. Esto le dará tiempo de completar el análisis de la solución prueba antes de tener que proceder con el blanco.

1. Añada 0.1 ml de peróxido de hidrógeno al 3 % al vaso de precipitado designado para el blanco y agite haciendo movimientos circulares.
2. Después de exactamente 20 minutos de incubación a 45° C agregue 1.0 ml de solución de bromelina y agite haciendo movimientos circulares.
3. Incube por 5 minutos más.
4. Remueva el vaso de precipitado del baño de agua y agitando constantemente inserte el electrodo del potenciómetro.
5. Registre el pH después de 10 segundos (pH inicial).
6. Ajuste el pH a 6.0 con NaOH 0.1 N (use aproximadamente 2-4 ml).  
\*Vea la nota de arriba.
7. Continúe agitando de modo constante y añada 10 ml de formaldehído al 37 % (pH 9.0).
8. Registre el pH después de 10 segundos y después de 1 minuto.
9. Titule a un pH de 9.0 con NaOH 0.1 N.
10. Registre el volumen de titulación. Este es el valor del blanco "B".

**Cálculos:**

Definición: Una unidad de digestión de gelatina es la cantidad de enzima que libera 1 mg de nitrógeno amino de una solución estándar de gelatina a pH 4.5 o pH 5.5 (GDU pH 4.5 o pH 5.5) después de 20 minutos de digestión a 45° C.

$$GDU/g = \frac{(T - B) \times 14 \times N \times 50}{Wt(g)} \quad Ec. 1$$

Dónde:

T = Volumen de titulación de la prueba (ml 0.1 N NaOH)

B = Volumen de titulación del blanco (ml 0.1 N NaOH)

N = Normalidad del NaOH estandarizado (i.e. 0.100)

Wt (g) = Peso inicial de la enzima

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] PRO ECUADOR, Perfil de Piña Ecuatoriana, 2011, Obtenido en Línea y Disponible en: <http://www.proecuador.gob.ec/>, Consultado en: Enero 2013
- [2] ALVARADO G. WENDY, “Estudio del Efecto de la Deshidratación Osmótica como Pre-tratamiento para el Proceso de Secado por Aire en Piña (Ananas Comosus) de la Variedad Milagreña o Perolera” (Tesis, Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción, Escuela Superior Politécnica del Litoral, 2006).
- [3] GUIDO M. MARITZA, Guía Técnica de Producción del Cultivo de Piña, Dirección General de Técnicas Agropecuarias, Nicaragua, 1983, Pág. 1-8.
- [4] HULME A. C., The Biochemistry of Fruits and their Products, Volumen II, 1971.
- [5] CICHOKI ANTHONY, Enzymes: The Sparks of Life, Books Alive, United Kingdom, 2008, Pág. 23.
- [6] POLAINA JULIO, Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications, Springer, Netherlands, 2007, Pág. 184-185.

- [7] MONTILLA ISABEL, El Cultivo de la Piña en Venezuela, Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Venezuela, 1997, Pág. 138-142.
- [8] RAMOS C. MARÍA, Obtención de Bromelinas a Partir de Desechos Agroindustriales de la Piña, Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, Obtenido en Línea y Disponible en: <http://www.smbb.com.mx/>, Consultado en: Enero 2013
- [9] NONHEBEL G., El Secado de Solidos en la Industria Química, Reverté S.A., España, 2002, Pág. 295-308
- [10] ORREGO A. CARLOS, Procesamiento de Alimentos, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, 2003, Pág. 208-211.
- [11] MULLER PAUL, Tecnologías de América del Norte para el Procesamiento de Alimentos, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, 1990, Venezuela, Pág. 82-87.
- [12] UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA, Determinación Cuantitativa de Proteínas, Obtenido en Línea y Disponible en: <http://www.quimica.unlp.edu.ar/>, Consultado en: Enero 2013
- [13] MACARULLA JOSE, Bioquímica cuantitativa: Cuestiones sobre metabolismo, Volumen II, Reverté S.A., España, 2002, Pág. 288.
- [14] ENZYME DEVELOPMENT CORPORATION, Proteases: Bromelain, Obtenido en Línea y Disponible en: <http://www.enzymedevelopment.com/>, Consultado en: Enero 2013

- [15]CHÁVEZ P. MARÍA, Proceso de Obtención de Bromelina a Partir de Tallos de Piña, Oficina Cubana de la Propiedad Industrial, Cuba, 1998, Pág. 8-11.
- [16]KURE JORGE; YUGCHA ANDREA, “Estudio del Proceso de Secado del Látex de Papaya (Carica Papaya L.) Deshidratado por Aspersión” (Tesis, Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción, Escuela Superior Politécnica del Litoral, 2012).
- [17]GAUTAM S, *et. al*, Comparative Study of Extraction, Purification and Estimation of Bromelain from Stem and Fruit of Pineapple Plant, Thai J. Pharm, India, 2010, Pág. 67-75.
- [18]REYES N. LUIS, “Optimización y Caracterización de la Micro encapsulación de la Proteasa Hemisfericina Refinada” (Tesis, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional, 2010)