

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la

Producción

“Comparación de la Concentración y Actividad Enzimática de la Bromelina Obtenida a Partir de la Pulpa de la Piña (*Ananas Comosus*) Variedad Perolera de Dos Grados de Madurez”

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del Título de:

INGENIERAS DE ALIMENTOS

Presentada por:

Diana Sofía Coello Montoya

Janella Juleen Hidalgo Torres

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2013

AGRADECIMIENTO

A nuestra directora de tesis, MSc. Priscila Castillo, por su apoyo y confianza en nosotras, y al Dr. Juan Manuel Cevallos, por su inagotable paciencia y colaboración, que nos permitieron culminar con éxito el presente trabajo.

Además agradecer al Dr. Efrén Santos, Ing. Freddy Orellana, Ing. Iván Chóez e Ing. Lisette Hidalgo, por su ayuda y apoyo.

Y, a las personas que con su ejemplo nos enseñaron que el camino correcto, a pesar de ser el más difícil y demandar más esfuerzo, al final siempre es el más grato y satisfactorio.

Diana y Yula

DEDICATORIA

A Dios, por darme la capacidad y mantenerme en la lucha.

A mis padres, Nelson y Amalia, por su amor incondicional, sus valores inculcados y su sacrificio para que pudiera terminar mi formación profesional.

A mis hermanos, Andrés y Ramiro, por su paciencia y compañía a lo largo de estos años de mi vida en los cuales han sido uno de mis principales pilares de apoyo.

Diana

DEDICATORIA

A Dios por haberme permitido culminar con éxito otra etapa de mi vida.

A las personas que creyeron y creen en mí.

A las que les prometí que siempre culminarían mis metas sin importar cuánto tiempo y esfuerzo me demanden.

Yula

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

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

MSc. Priscila Castillo S.
DIRECTORA DE TESIS

Dr. Juan Cevallos C.
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).

Diana Sofía Coello Montoya

Janella Juleen Hidalgo Torres

RESUMEN

El presente estudio se realizó con el objetivo de comparar la concentración y actividad enzimática de la bromelina extraída de la pulpa de la piña (*Ananas comosus*) variedad Perolera con dos diferentes grados de madurez, con el fin de proponer el mejor estado de maduración para la extracción de la enzima a nivel comercial.

Se caracterizó la fruta para cada estado de madurez (12 y 18 meses), encontrando que el peso y los grados Brix son características físico-químicas que marcan la diferencia entre un estado y otro, y que el ratio, en el caso de las piñas, no es una característica significativa para determinar su madurez. La extracción de la enzima cruda fue realizada mediante un buffer de fosfato, EDTA y cisteína, sometiendo la muestra a centrifugación (8000 rpm) por 30 minutos a 4°C; mientras que la purificación enzimática se realizó por un Sistema Bifásico Acuoso (SBA) en el que se obtuvo un índice de purificación de 2.16 y un porcentaje de recuperación de la actividad enzimática de 130.21%.

La medición de la concentración proteica en el extracto crudo y purificado se realizó mediante el método de Bradford, obteniendo para la fruta de 12 meses una concentración proteica promedio de 0.23 mg/ml en el extracto crudo y 0.14 mg/ml en el purificado, mientras que para la piña de 18 meses 0.32 mg/ml en el extracto crudo y 0.2 mg/ml en purificado, encontrándose diferencia significativa entre las concentraciones proteicas en el extracto crudo y en el purificado de cada estado de madurez, con un 95% de confianza.

La actividad enzimática fue medida mediante el método de Unidad de Tirosina y junto con las concentraciones proteicas de cada muestra, se calcularon las actividades específicas (Aesp) de cada estado de madurez. Con un 95% de confianza se encontró que existe diferencia significativa entre las Aesp de las piñas de 12 y 18 meses, teniendo valores de 184.62 TU/mg y 65 TU/mg, respectivamente.

Se pudo determinar que el mejor estado fisiológico entre los dos periodos de tiempo estudiados fue el de 12 meses al presentar una mayor actividad específica, por lo que se procedió a liofilizarla para lograr su conservación y se obtuvo una actividad enzimática de bromelina liofilizada de 16.66 TU/ml, logrando conservar su actividad en un 68.75%.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	I
ÍNDICE GENERAL.....	III
ABREVIATURAS.....	VI
SIMBOLOGÍA.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
INTRODUCCIÓN.....	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
HIPÓTESIS DEL PROYECTO.....	3
OBJETIVOS.....	3
 CAPÍTULO 1	
1. GENERALIDADES.....	5
1.1. Materia prima.....	5
1.1.1. Ananas comosus.....	5
1.1.2. Distribución y variedades de piñas que se cultivan en el país ...	9
1.1.3. Características físico-químicas y valor nutricional de la piña perolera.....	12
1.2. Enzimas de la piña.....	14
1.2.1. Bromelina.....	15
1.3. Métodos de purificación enzimática.....	22

1.4.	Métodos de medición de concentración de proteína.....	26
1.5.	Métodos de medición de actividad enzimática.....	29
1.6.	Liofilización de enzimas	33
1.7.	Aplicación de la Bromelina en la industria.....	38

CAPÍTULO 2

2.	MATERIALES Y MÉTODOS	40
2.1.	Materiales, Reactivos y Equipos	41
2.2.	Preparación de reactivos	43
2.2.1.	Buffer de extracción	43
2.2.2.	Reactivos del método de purificación-Sistema Bifásico Acuoso	44
2.2.3.	Reactivos para la medición de actividad	45
2.3.	Metodología experimental.....	45
2.3.1.	Diseño de Experimento	45
2.3.2.	Medición de las características físico-químicas de la piña	51
2.3.3.	Método de extracción enzimática	53
2.3.4.	Método de purificación - Sistema Bifásico Acuoso.....	55
2.3.5.	Determinación de la cantidad de proteína.....	57
2.3.6.	Determinación de la actividad enzimática	61
2.3.7.	Liofilización enzimática.....	68

CAPÍTULO 3

3.	ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	70
3.1.	Análisis de las características de la piña de acuerdo al estado fisiológico	70
3.2.	Análisis de Concentración proteica	87
3.2.1.	Curva de calibración del método de Bradford	87
3.2.2.	Concentración proteica en extracto crudo.....	89
3.2.3.	Concentración de enzima purificada	93

3.3.	Análisis de actividad enzimática	99
3.3.1.	Curva de calibración del método de Unidad de Tirosina	99
3.3.2.	Actividad enzimática de enzima cruda	101
3.3.3.	Actividad enzimática de enzima purificada.....	104
3.4.	Determinación y análisis del estadio con mejor actividad proteolítica.....	111
3.4.1.	Relación Actividad específica vs. Madurez	111
3.4.2.	Análisis de la pérdida de actividad enzimática por el proceso de liofilización.....	113

CAPÍTULO 4

4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	116
----	--------------------------------------	-----

APÉNDICES

BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

kg	kilogramos
mg	miligramo
µg	microgramos
km	kilómetro
cm	centímetro
l	litro
ml	mililitro
ul	microlitro
h	hora
min	minuto
umol	micromol
SS	Sólidos solubles
ATT	Acidez Total Titulable
UV	Ultravioleta
nm	nanómetro
GDU	Unidad de Digestión de Gelatina
CDU	Unidad de Digestión de Caseína
MCU	Unidad de Coagulación de Leche
TU	Unidad de Tirosina
UP	Unidad de Papaína
EDTA	Ácido Etilendiaminotetracético
PEG	Polietilenglicol
BSA	Albúmina Sérica Bovina
mM	milimolar
M	molar
N	normalidad
Meq	miliequivalente
rpm	revoluciones por minuto
rcf	fuerza centrífuga relativa
EC	Extracto Crudo
EP	Enzima Purificada
AE	Actividad enzimática

Aesp	Actividad específica
FD	factor de dilución
IC	intervalo de confianza
GL	grados de libertad
Desv.Est.	desviación estándar
SC	suma cuadrática
MC	media cuadrática
col	colaboradores

SIMBOLOGÍA

H_0	Hipótesis nula
H_1	Hipótesis alterna
vs.	Versus
%	porcentaje
v	volumen
p	peso
β	potencia
n	tamaño muestral
v1	grados de libertad del numerador
v2	grados de libertad del denominador
σ^2	varianza
σ	desviación estándar
α	alfa
a	número de muestras
e	error
°	grados
HCl	ácido clorhídrico
NaOH	hidróxido de sodio
\pm	más menos
°C	grados centígrados
P	probabilidad
Cov	covarianza

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.1. Retoños de la planta de piña	8
Figura 1.2. Estructura de la bromelina	17
Figura 1.3. Esquema representativo de la interacción enzima-sustrato para los subsitios del sitio activo de una peptidasa	19
Figura 1.4. Mecanismo de acción catalítica de las cistein-proteasas.....	21
Figura 1.5. Distribución esquemática de la molécula en SBA.....	23
Figura 1.6. Representación esquemática del comportamiento de partición de la biomolécula en SBA.....	24
Figura 1.7. Diagrama de Fase	35
Figura 1.8. Superficie de sublimación (seca) profundizando en la pastilla congelada	37
Figura 2.1. Resumen gráfico de la prueba piloto	48
Figura 2.2. Prueba de Anova Unidireccional.....	50
Figura 2.3. Método de Extracción	54
Figura 2.4. Separación del Sistema Bifásico Acuoso.....	56
Figura 2.5. Procedimiento de preparación de muestras	59
Figura 2.6. Procedimiento de lectura del espectrofómetro	61
Figura 2.7. Medición de actividad enzimática	64
Figura 2.8. Liofilizador.....	68
Figura 3.1. Gráfica de Cajas de Peso	73
Figura 3.2. Gráfica de Cajas de pH.....	76
Figura 3.3. Gráfica de caja de Brix.....	79

Figura 3.4. Gráfica de caja de Acidez	83
Figura 3.5. Curva de calibración del método de Bradford.....	88
Figura 3.6. Gráfica de cajas de concentración EC.....	92
Figura 3.7. Gráfica de cajas de Concentración Purificada	96
Figura 3.8. Gráfica de interacción entre Concentración Enzimática y Madurez	98
Figura 3.9. Curva de calibración del método de Tirosina.....	100
Figura 3.10. Gráfica de cajas de Actividad Cruda.....	104
Figura 3.11. Gráfica de Cajas de Actividad Purificada.....	108
Figura 3.12. Gráfica de interacción entre Actividad Purificada y Madurez..	110
Figura 3.13. Gráfica de relación de Actividad y Concentración vs Madurez	112
Figura 3.14. Gráfica de interacción entre Actividad Específica y Madurez .	113
Figura 3.15. Gráfica de comparación de actividades enzimáticas	114

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA PIÑA	6
TABLA 2. PRODUCCIÓN TOTAL DE LA PIÑA ECUATORIANA	10
TABLA 3. COMPOSICIÓN FÍSICA DE LA PIÑA PEROLERA	14
TABLA 4. PROPIEDADES FÍSICAS DE LA BROMELINA DEL FRUTO	18
TABLA 5. PESOS DE REACTIVOS EN BUFFER DE EXTRACCIÓN	44
TABLA 6. DATOS DE LA PRUEBA PILOTO	47
TABLA 7. VOLÚMENES DE LA SOLUCIÓN PATRÓN BSA Y AGUA DESTILADA	57
TABLA 8. CONCENTRACIONES USADAS PARA LA ELABORACIÓN DE LA CURVA DE TIROSINA	62
TABLA 9. CONDICIONES DEL LIOFILIZADOR	69
TABLA 10. DATOS EXPERIMENTALES DEL PESO	71
TABLA 11. RESULTADOS DE LA PRUEBA T E IC DE DOS MUESTRAS: PESO. MADUREZ	72
TABLA 12. DATOS EXPERIMENTALES DE PH	74
TABLA 13. RESULTADOS DE LA PRUEBA T E IC DE DOS MUESTRAS: PH. MADUREZ	75
TABLA 14. DATOS EXPERIMENTALES DE GRADOS BRUX DE LA PIÑA .	77
TABLA 15. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE MANN-WHITNEY E IC: BRUX. MADUREZ	78
TABLA 16. DATOS EXPERIMENTALES DE ACIDEZ DE LA PIÑA	81
TABLA 17. RESULTADOS DE LA PRUEBA T E IC DE DOS MUESTRAS: ACIDEZ. MADUREZ	82

TABLA 18. DATOS DEL RATIO DE LA PIÑA.....	85
TABLA 19. RESULTADOS DE LA PRUEBA T E IC DE DOS MUESTRAS: RATIO. MADUREZ	86
TABLA 20. RESULTADOS DE LA ABSORBANCIA PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL MÉTODO DE BRADFORD.....	88
TABLA 21. VALORES DE CONCENTRACIÓN PROTEICA EC.....	90
TABLA 22. RESULTADOS DE LA PRUEBA T E IC DE DOS MUESTRAS: CONCENTRACIÓN EC. MADUREZ.....	91
TABLA 23. VALORES DE CONCENTRACIÓN ENZIMÁTICA EP.....	94
TABLA 24. RESULTADOS DE LA PRUEBA T E IC DE DOS MUESTRAS: CONCENTRACIÓN EP. MADUREZ.....	95
TABLA 25. DATOS DE ABSORBANCIA PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL MÉTODO DE UNIDAD DE TIROSINA.....	100
TABLA 26. VALORES DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EC	101
TABLA 27. RESULTADOS DE LA PRUEBA T E IC DE DOS MUESTRAS: ACTIVIDAD EC. MADUREZ	103
TABLA 28. VALORES DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EP	105
TABLA 29. RESULTADOS DE LA PRUEBA T E IC DE DOS MUESTRAS: ACTIVIDAD EP. MADUREZ	107
TABLA 30. RESULTADOS DEL SISTEMA DE PURIFICACIÓN	109

INTRODUCCIÓN

Las proteasas son enzimas de gran interés en la enzimología debido a que representan alternativas tecnológicas en procesos alimenticios, farmacéuticos, textiles, entre otros. La bromelina es una proteasa obtenida de la piña (*Ananas comosus*), que actualmente se encuentra bajo estudios, la mayoría de éstos investigados y constatados a nivel médico y dentro del campo de las aplicaciones tecnológicas. Sin embargo, existe poca investigación en cuanto a las características de la fuente de obtención de la enzima, como lo es la madurez de la fruta al momento de la extracción, que según la teoría expuesta por Heinicke & Gortner (1996), la concentración de la enzima es mayor en los frutos maduros, mientras que Caygill & Etherington (1996) afirman que la actividad en la fruta verde es el doble de la madura, encontrándose que existe una relación inversa entre la actividad y concentración con respecto al tiempo de maduración de la fruta, sin existir estudios conjuntos de ambas teorías, posibles causas, ni la especificación de las variedades estudiadas en dichos comportamientos, lo que nos llevó al estudio comparativo de la concentración y la actividad enzimática de la

bromelina, para la comprobación de la teoría de la influencia de la madurez de la piña variedad Perolera, cultivada en nuestro país.

La variedad Perolera es la de mayor cultivo en el país y se consume solo a nivel nacional, por lo que este estudio no solo aportará el conocimiento de las mejores condiciones de extracción de la enzima con respecto al tiempo de maduración en nuestra variedad, sino que también permitirá crear un valor agregado a esta variedad de la fruta, sin descartar la idea del impulso de nuevas áreas en la matriz productiva, recordando siempre que el desarrollo de un país va de la mano de la investigación.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Tiene diferencia significativa la concentración y actividad enzimática de la bromelina extraída de la piña (*Ananas comosus*) variedad Perolera con dos grados de madurez, cultivada en el Ecuador?

HIPÓTESIS DEL PROYECTO

La concentración y la actividad de la enzima bromelina extraída de la pulpa de la piña (*Ananas comosus*) variedad Perolera, se ve afectada por el estado fisiológico de la piña.

OBJETIVOS

Objetivo General

Comparar la concentración y actividad enzimática de la bromelina extraída de la pulpa de la piña (*Ananas comosus*) variedad Perolera, con dos diferentes grados de madurez, con el objetivo de proponer el mejor grado de madurez para la extracción de la enzima a nivel comercial.

Objetivos Específicos

- ✓ Caracterizar la piña de acuerdo a su grado de madurez, mediante análisis físico-químico.

- ✓ Extraer la enzima bromelina de la pulpa de la fruta *Ananas comosus*, de la variedad Perolera, con dos grados de madurez diferentes y purificar a través de un sistema bifásico acuoso, el extracto enzimático obtenido.
- ✓ Medir la concentración proteica y la actividad enzimática del extracto crudo y de la enzima purificada mediante espectrofotometría, expresado en mg de enzima/ml de extracto y en TU/ml de enzima, respectivamente y realizar un contraste de hipótesis para determinar si el grado de madurez de la fruta tiene efecto sobre la concentración proteica y la actividad enzimática de la bromelina extraída.
- ✓ Determinar el mejor estado de madurez para la extracción de la enzima de acuerdo a la actividad específica de cada estadio.
- ✓ Establecer el porcentaje de pérdida de actividad enzimática de la bromelina liofilizada del mejor estado de madurez.

CAPÍTULO 1

1. GENERALIDADES

1.1. Materia prima

1.1.1. *Ananas comosus*

La piña cuyo nombre científico es *Ananas comosus*, pertenece a la familia de las Bromeliaceae en la cual se encuentran aproximadamente 50 géneros y unas 2000 especies. La clasificación de las especies del género *Ananas* ha sido muy variada, sin embargo desde 1977 se considera que las especies de *Ananas* son *A. monstrosus*, *A. ananassoides*, *A. nanus*, *A. paraguayensis*, *A. lucidus*, *A. bracteatus*, *A. fritzmuelleri* y *A. comosus* [1].

La Tabla 1 detalla la clasificación taxonómica de la piña.

TABLA 1
CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA PIÑA

Categoría	Grupo
Reino	Vegetal
Phyllum	Pteridofita
Clase	Angiosperma
Subclase	Monocotiledónea
Orden	Farinosae
Familia	Bromeliáceas
Género	Ananas
Especie	Comosus

Fuente: Referencia [2]

Todas las especies de Ananas son nativas de la cuenca amazónica, se ha señalado como el área de origen la cuenca superior del Paraná entre Brasil, Paraguay y Argentina; las selvas del curso superior del Amazonas, y las regiones semisecas de Brasil, Venezuela y Guyana, posteriormente se cultivó en Asia y África [3].

La piña es una planta monocotiledónea herbácea perenne que mide 1 a 1.2 metros, se desarrolla a temperatura

óptima promedio de 28°C, con alta luminosidad, suelos aireados con pH de 4.5 a 5 y vientos no mayores a 50 km/h [4].

La forma de la fruta puede ser oblonga o cónica, color verdoso amarillento, rojizo o amarillo anaranjado, según la variedad y el estado de madurez [5], y un peso promedio de 0,5 a 2 kg cambiando de acuerdo a la variedad plantada, densidad y manejo del cultivo [6]. La corteza dura y cerosa del fruto está formada por los ojuelos o escudetes, los cuales llegan a tener un diámetro de 2.5 cm y al momento de la cosecha sus bordes se encuentran delineados por una tonalidad amarillo-verde [7].

Desde el punto de vista fisiológico, la piña es una fruta no climatérica, debido a que una vez cosechada su grado de madurez (ratio) no varía; sin embargo, el color de la cáscara puede cambiar [6].

Se puede considerar desde el punto de vista botánico que la piña no es un fruto verdadero, ya que al no formar

semillas no puede reproducirse sexualmente, es por esto que la propagación o reproducción de la piña se realiza por el método asexual utilizando los retoños que emergen de las diferentes partes de la planta, conocidos como coronas, hijos basales y yemas axilares. Cada planta produce una sola piña sobre su vástago central, la cual alcanza la madurez 18 o 22 meses después de ser plantada, pero puede cultivarse en un periodo de tiempo comprendido de 5 a 5.5 meses [6].

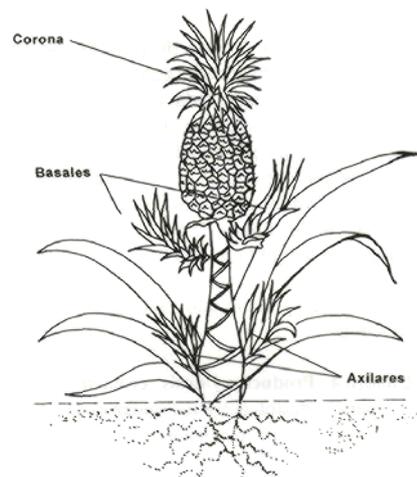


Figura 1.1. Retoños de la planta de piña

Fuente: Referencia [8]

La segunda cosecha se realiza 12 meses más tarde, en esta se recolectan solo los hijuelos que tengan una longitud

entre 25 y 30 cm [6]. La planta puede ser cosechada máximo dos veces, lo que en el periodo de tiempo de cosecha corresponde a dos años y medios, debido a que la cosecha se realiza cada 18 meses [7].

1.1.2. Distribución y variedades de piñas que se cultivan en el país

La distribución de la piña en el país fue obtenida por medio de los datos del censo económico nacional a través de ESPAC, Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua del 2011. En la tabla 2 se muestra el resumen de la producción y venta de piña en toneladas métricas [9].

En el país las variedades cultivadas de *Ananas comosus* para la exportación son “Cayena Lisa” o “Hawaiana” y “Golden Sweet” o “súper dulce” conocida como MD2 [10]. En el mercado nacional, se consume la piña tipo “Perolera” o “Milagreña”, variedad originaria del Brasil [5].

TABLA 2
PRODUCCIÓN TOTAL DE LA PIÑA ECUATORIANA

ÁMBITO	NÚMERO DE ÁRBOLES	PRODUCCIÓN (Tm)	VENTAS (Tm)
TOTAL NACIONAL	133.487,00	123	26
Región Sierra	1.564,00	1	
Región Costa	2.665,00	2	
Región Oriente	129.258,00	120	26
Cotopaxi	22		
Loja	1.542,00	1	
El Oro	1.392,00	1	
Esmeraldas	385		
Guayas	398	1	
Manabí	489	1	
Nororiente	25.399,00	24	
Centro-Suroriente	103.860,00	96	26

Fuente: Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria

Continua, ESPAC, 2011 [9]

Cayena lisa: Las hojas son lisas a excepción de las espinas en la punta y en la base. Es la principal variedad destinada para la comercialización, el fruto es de pulpa amarilla y con un peso que oscila de 2 a 4 kg, de forma cilíndrica y un corazón pequeño [11]. La pulpa tiene tonalidades amarillas, es dulce, suavemente acidulada y

aromática [12]. Las principales zonas de producción son Hawaii, Tailandia, Filipinas, oeste de África y Martinica [13].

Golden Sweet o MD2: Es una variedad de reciente introducción al país que por su presentación, aroma, etc. está catalogada como una fruta de lujo en los mercados externos [13]. Tiene buen tamaño, color atractivo y dorado en la cáscara, pulpa amarilla intensa, procede de Costa Rica y posee unas cualidades gustativas excelentes, muy dulces y cada vez más apreciadas en el mercado, se exporta a países como Estados Unidos y Canadá [12].

Perolera o Milagreña: Su fruto está destinado al consumo local en fresco. Esta variedad tiene corazón grueso y pulpa blanca, característica que la hace poco utilizada para la industrialización [5]. Posee hijos sin espinas, el fruto cuando madura es de color amarillo naranja, con ojos profundos, corona única y forma cilíndrica pesando alrededor de 2 Kg. Es una variedad muy apetecida por su sabor y calidad, y es bastante resistente al transporte. Tiene contenido medio de fibra y forma cónica [14], además de tener bajo contenido

de azúcar (12 °Brix) [15]. Ecuador posee condiciones geográficas favorables para el cultivo de la piña, pues posee un clima tropical seco y tropical húmedo [5].

1.1.3. Características físico-químicas y valor nutricional de la piña perolera

La piña está clasificada como una fruta cuyo contenido en carbohidratos varía entre 10% y 15% y el contenido de ácido ascórbico es 12 mg/100 g de pulpa sin corazón. La contribución de la vitamina C a la actividad antioxidante total en la piña perolera es del 5.20%, también se ha establecido la existencia de fenoles y polifenoles que son antioxidantes muy poderosos. En la piña el contenido total fenólico es de 94.3 ± 1.5 mg/100 g de pulpa fresca y la actividad antioxidante total de 100 g de pulpa es equivalente a la de 298 mg de Vitamina C [16], el cual es mayor al requerido por el ser humano, siendo la dosis más alta 90 mg por día para hombres adultos [17].

En ciertos cultivos de Colombia se han realizados estudios en la piña perolera mostrando la presencia de ácido succínico, málico y cítrico, siendo este último el de mayor concentración en todos los casos [16].

En general, la composición química de la misma varía dependiendo de la época. Se cultiva en verano, con temperaturas elevadas, presentando mayor azúcar y menor acidez, comparadas con frutas fuera de época; presenta un 66% de sacarosa y un 34% de azúcares reductores como glucosa y fructuosa, con una acidez de 0.79 a 1.11%. Contiene nitrógeno total en la cantidad de 500 mg/l, y en pequeñas porción de forma orgánica, como proteínas, péptidos, aminoácidos; cabe mencionar aquí la presencia de la bromelina, una enzima proteolítica que se encuentran mayoritariamente en el cilindro central [18].

En la Tabla 3 se puede apreciar las características físicas de la piña, variedad perolera.

TABLA 3
COMPOSICIÓN FÍSICA DE LA PIÑA PEROLERA

Peso (Kg.)	2.02
Diámetro:	10.68
Apical (cm)	14.28
Medio (cm)	11.08
Basal (cm)	
Longitud (cm)	15.30
Longitud Corona (cm)	16.28
Profundidad ojos (cm)	1.23
Diámetro Central (cm)	3.55
Porcentaje Pulpa	61.89
Porcentaje Corteza	34.05
Porcentaje Jugo	49.60
Sólidos Solubles (°Brix)	13.25
Acidez (%)	0.52
SS/ATT	25.48
Fibra (%)	0.56
Color Pulpa	Rosado Pálido

Fuente: Primer simposio Internacional de Piñicultura.

Memorias [14]

1.2. Enzimas de la piña

En la piña se han encontrado cuatro tipos representativos de endopeptidasas, las llamadas bromelina del tallo, del fruto,

ananaina y comasina, estas dos últimas representan apenas el 5% y el 1% de las proteínas totales del extracto crudo del tallo, respectivamente [19].

Las endopeptidasas son las enzimas que inician la digestión de las proteínas al hidrolizar las uniones internas de las cadenas polipeptídicas dando como resultados nuevos residuos N y C-terminales, que llegan a ser los sustratos para las exopeptidasas. Estas enzimas son especialmente interesantes debido a que no son reemplazables por enzimas procedentes de microorganismos [20].

1.2.1. Bromelina

Definición

La bromelina es una enzima proteolítica proveniente de la piña, esta puede tener una afinidad hacia las cadenas polipeptídicas dependiendo de su origen (tallo o fruto). El presente estudio está basado en la bromelina proveniente del fruto (EC 3.4.22.33), la cual presenta afinidad hacia los aminoácidos Bz-Phe-Val-Arg-|-NHMe, que difieren de los

aminoácidos presentes en la cadena target de la bromelina del tallo (Z-Arg-Arg-|-NHMe) [19].

En general se puede decir que las primeras características de esta enzima van a estar dadas por su denominación EC 3.4.22.33, EC son las siglas en inglés del organismo encargado de la clasificación de las enzimas (Enzyme Commissions), el primer dígito nos dirá a qué familia pertenece siendo 3 el número de las hidrolasas, el número 4 corresponde a la clase de las liasas, en el número 22 se han clasificado a las enzimas endopeptidasas cisteínicas, clasificación dada por su forma catalítica y el número 33 es específico para la bromelina del fruto [19].

Propiedades y Funciones

La bromelina del fruto es una cistein-proteasa de carácter ácido, se trata de una glucoproteína aparentemente homogénea [21], que hidroliza enlaces peptídicos, la cual se encuentra conformada por un residuo amino terminal, la valina y su carboxilo terminal, la glicina. La enzima se

encuentra constituida por los aminoácidos: Arginina, Ácido Aspártico, Serina, Prolina, Alanina, Valina, Glicina, Metionina y Glucosamina [15]. En la figura 1.2 se puede observar la estructura que presenta la bromelina.

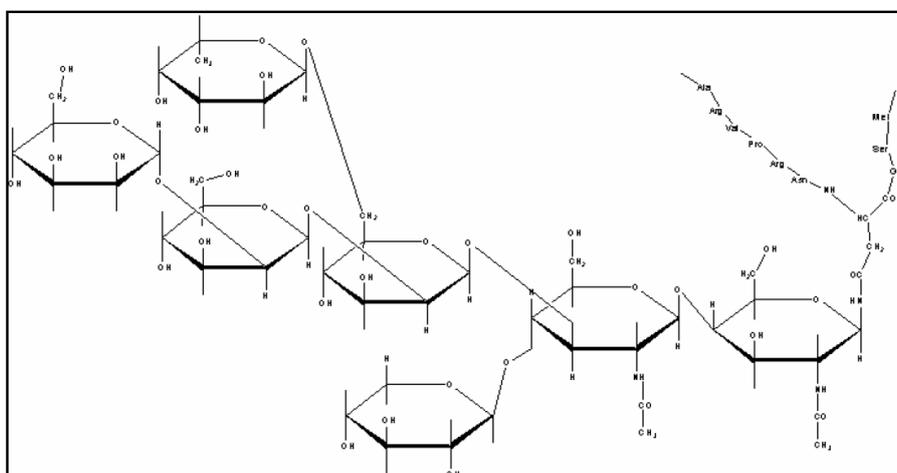


Figura 1.2. Estructura de la bromelina

Fuente: Referencia [15]

Las principales características físicas de la enzima se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4
PROPIEDADES FÍSICAS DE LA BROMELINA DEL
FRUTO

Peso molecular	24 – 33 KDa
Solubilidad	Completa en agua
pH óptimo	5
Temperatura óptima	40 °C
Temperatura de inactivación	70 °C
Color	Blanco

Fuente: Referencia [15, 22, 23]

Mecanismo de Acción

Las cisteino-proteasas son catalizadores de hidrólisis de uniones peptídicas, amidas, ésteres y tiol-ésteres [19].

Se ha propuesto un modelo conceptual donde se consideran los residuos de aminoácidos del sustrato (P) que se unen a subsitios del sitio activo de la enzima (S). Estos residuos se numeran a partir del enlace a ser clivado hacia el N-terminal como P1, P2, P3, etc., en tanto que los que se encuentran hacia el C-terminal se denominan P1', P2', P3', etc. Los subsitios de la proteasa que “acomodan” los

residuos del sustrato se numeran como S1, S2, S3 y S1', S2', S3', respectivamente, (Figura 1.3) [24].

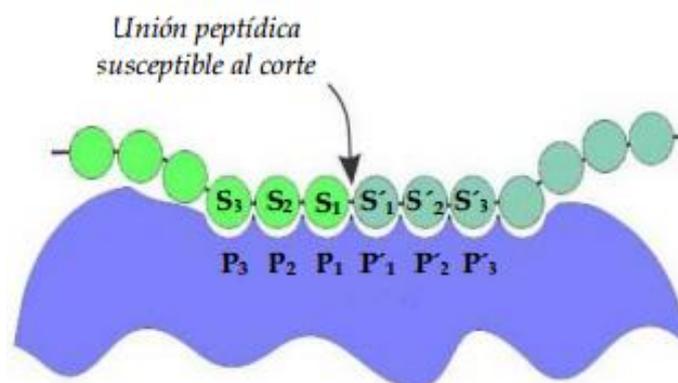


Figura 1.3. Esquema representativo de la interacción enzima-sustrato para los subsitios del sitio activo de una peptidasa

Fuente: Referencia [24]

Las características principales del mecanismo catalítico incluyen la formación de un intermediario covalente, la acil-enzima, resultante del ataque nucleofílico que involucra a un residuo de cisteína, histidina y asparagina formando lo que se conoce como una triada [19]. El grupo tiol de la cisteína actúa como nucleófilo, el mismo que se encuentra estabilizado a través de la formación de un par iónico con el

grupo vecino imidazol de la histidina, siendo entonces el nucleófilo atacante el par iónico tiolato-imidazol [24].

Cuando se da la unión enzima-sustrato el ión imidazol ayuda a la protonación del residuo del aminoácido resultante como producto, haciendo más fácil la acilación, ahora el sustrato tiene un grupo carboxi terminal el cual se liberara del complejo enzima-sustrato por medio de una molécula de agua, produciendo la disociación de la enzima y los nuevos compuestos. En la Figura 1.4 se puede observar los pasos detallados del mecanismo de acción de la enzima.

El papel de la asparagina dentro de la catálisis será el de redireccionar al imidazol de modo de colocarlo en posición óptima para cada una de las distintas etapas del mecanismo catalítico, además de ayudar en la estabilización del par tiolato-imidazol, manteniendo al anillo imidazólico en una orientación relativa favorable con respecto al residuo cisteínico [19].

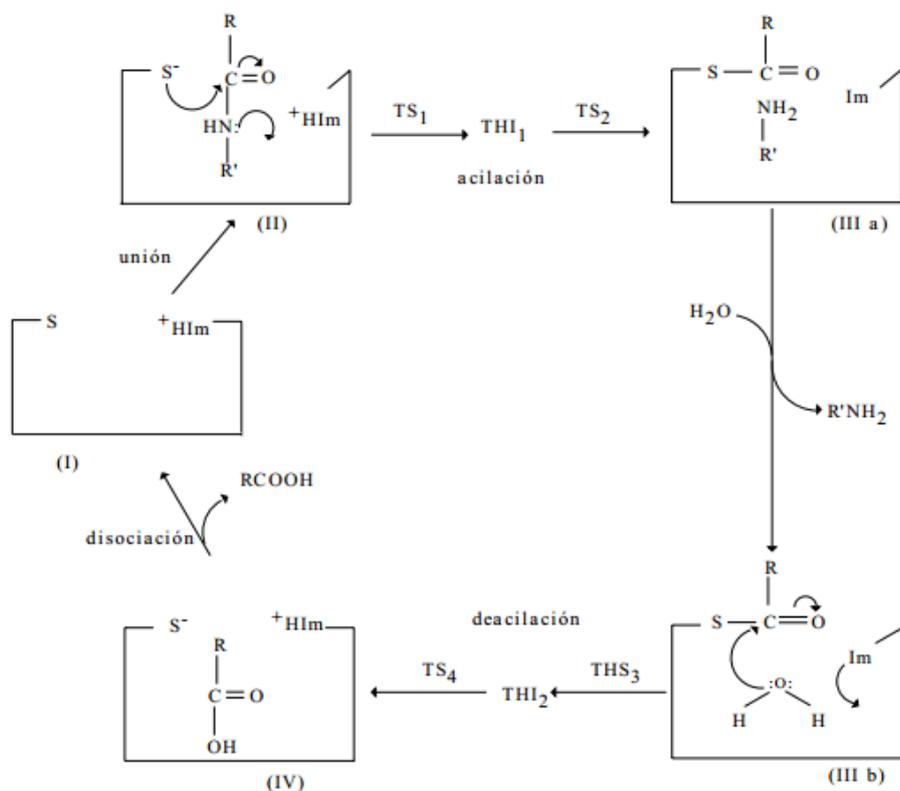


Figura 1.4. Mecanismo de acción catalítica de las cistein-proteasas

Fuente: Referencia [19]

Finalmente, la actividad sobre la caseína como sustrato, dependerá del origen, ya que la bromelina del fruto (ácida) tiene una mejor actividad en comparación con la del tallo (básica) [21].

1.3. Métodos de purificación enzimática

Extracción Líquido – Líquido (Sistema bifásico acuoso)

El proceso de extracción líquido-líquido consiste en la transferencia de una sustancia a partir de una mezcla líquida a otra fase líquida inmisible (o parcialmente miscible) al ponerlos en contacto. Este proceso es ampliamente utilizado en las industrias químicas y farmacéuticas, en la recuperación de los antibióticos o ácidos orgánicos a partir de caldos de fermentación. Sin embargo, la aplicación en la purificación de proteínas es todavía limitado principalmente debido a la posibilidad de desnaturalización de la proteína en contacto con disolventes orgánicos, obteniéndose un producto inútil [25].

Existen varias condiciones para la formación de los sistemas bifásicos de acuerdo a sus componentes, mismas que se pueden agrupar en dos grupos: el primero en el que el sistema se encuentra formado por dos polímeros y el segundo que está formado por un polímero y una sal; este último presenta una menor viscosidad considerada como una ventaja. Los polímeros utilizados son polietilenglicol, dextrano, polivinilpirrolidona y hidroxipropildextrano,

los de mayor uso son el polietilenglicol y el dextrano debido a su baja toxicidad [26].

En la Figura 1.5 se puede observar la forma como se produce la partición de la molécula en el SBA, en el cual una vez realizado el proceso se distingue claramente la formación de dos fases: la fase top o fase superior, formada por la enzima y el polímero, y la fase bottom o fase inferior, formada por la sal y los compuestos precipitables.

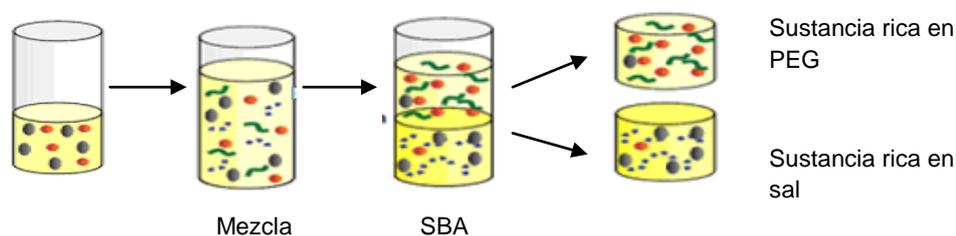


Figura 1.5. Distribución esquemática de la molécula en SBA

Fuente: Referencia [26]

Los fenómenos que se observan cuando el sistema no funciona adecuadamente y se ve afectada la partición de la molécula son el volumen de exclusión y el salting out [25].

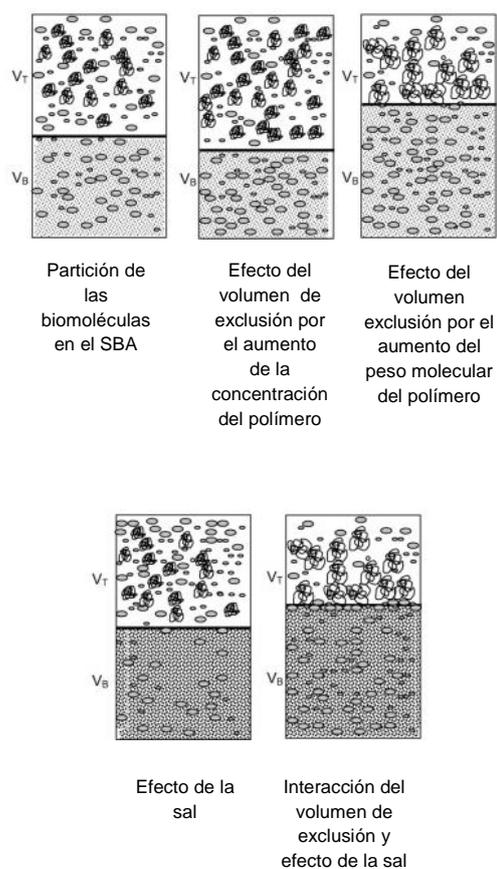


Figura 1.6. Representación esquemática del comportamiento de partición de la biomolécula en SBA

Fuente: Referencia [25]

El volumen de exclusión se da debido al aumento del espacio ocupado por el polímero en la superficie, por su gran peso molecular o elevada concentración, obligando a la biomolécula a quedarse en la fase de la sal (fase bottom), debido a la falta de espacio en la parte superior. El efecto contrario se lo conoce como salting out donde una mayor concentración de sal obliga a la

biomolécula a particionarse hacia la fase de arriba. El efecto combinado del salting out y el volumen de exclusión produce el particionamiento de la biomolécula en la interfase del sistema, por lo que la concentración de la sal y del polímero son factores predominantes en la purificación de la biomolécula [25]. En la Figura 1.6 se pueden observar los fenómenos antes mencionados.

Dentro de los indicadores de la efectividad de purificación del sistema bifásico, se encuentran el factor de purificación y el porcentaje de recuperación de la actividad enzimática [26].

El porcentaje de recuperación de la actividad enzimática representa el aumento de la actividad del compuesto purificado con respecto al inicial y el factor de purificación representa la actividad por miligramos del extracto purificado en relación al crudo, por lo que sería el mejor indicador para la selección de las condiciones del sistema, debido a que considera la efectividad del mismo en base a las dos características de mayor importancia, concentración y actividad.

1.4. Métodos de medición de concentración de proteína

Los métodos para medir la concentración de proteínas totales pueden clasificarse en:

Físicos

Se basa en la propiedad intrínseca de las proteínas para absorber luz en el UV. Desarrollado en múltiples variantes, aunque la más recomendada es la de Scopes. Se basa en la propiedad de las proteínas de tener un máximo de absorción a 280 nm debido al contenido en los aminoácidos tirosina y triptófano [27]. Su principal limitación es que no todas las proteínas tienen la misma proporción de estos aminoácidos, lo que le resta exactitud [28].

Químicos

Reacción de Kjeldahl: Considerado históricamente como el método referencia [28].

Reacción de Biuret: Se fundamenta en la formación de un complejo, en medio alcalino, entre el Cu^{2+} y los enlaces peptídicos (absorbancia a 540 nm) [28]. La intensidad de coloración es directamente proporcional a la cantidad de enlaces peptídicos y la reacción es bastante específica, de manera que pocas sustancias interfieren. La sensibilidad del método es muy baja y sólo se recomienda para la cuantificación de proteínas en preparados muy concentrados [29].

Método de Lowry: Se basa en la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu provocada por el complejo unión peptídico- Cu^{2+} en medio alcalino [28]. La formación del complejo coloreado entre el Cu^{2+} y los nitrógenos de los enlaces peptídicos se da por la reacción de Biuret, luego para resaltar el color formado en esta reacción y aumentar la sensibilidad, se hace reaccionar posteriormente con el reactivo de Folin-Ciocalteu que al ser reducido por los residuos de aminoácidos aromáticos tirosina y triptófano, da un color azulado [27].

Método de BCA: El ácido bicinconínico, sal sódica, es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con

iones Cu^{1+} en medio alcalino. Este reactivo forma la base de un método analítico capaz de monitorizar el ión cuproso producido en una reacción entre las proteínas con Cu^{2+} en medio alcalino (reacción de Biuret) [29].

Método de Bradford: Es una técnica sensible que consiste en la medición de la extinción provocada por el cambio en el espectro visible de un colorante (Coomasie Blue G-250) cuando éste se une a las proteínas (absorbiendo así a 595 nm). Esta unión se realiza a través de grupos ionizados y se comprueba proporcionalidad con la concentración de proteínas contenidas en la muestra [28]. El colorante cambia de color de marrón a azul al unirse a proteínas [26]. Este método es sensible (1-15 μg), simple, rápido, barato y pocas sustancias interfieren en su determinación. Entre las sustancias que interfieren están los detergentes y las soluciones básicas [29].

No existe un sistema totalmente satisfactorio para determinar la concentración proteica de una muestra. La elección de un método u otro se basa en la naturaleza de la proteína y del resto de

componentes de la muestra, y en la sensibilidad y precisión requeridos [27].

La determinación del contenido proteico de una muestra requiere la comparación del valor de su absorbancia con los obtenidos a partir de cantidades conocidas de proteínas, con los que se construye una curva de calibración [28].

El método utilizado en este estudio fue el de Bradford, debido a su rapidez, facilidad y mayor sensibilidad, además de permitirnos realizar una comparación entre estudios efectuados de concentración proteica de la piña (*Ananas comosus*).

1.5. Métodos de medición de actividad enzimática

La cantidad de enzima en una muestra puede ser expresada en moles, como la de cualquier otro compuesto químico, o puede ser cuantificada en términos de actividad enzimática. La actividad enzimática es una medida de la cantidad de enzima activa presente y del nivel de actividad de la misma, por lo que es una medida

dependiente de las condiciones de trabajo, mismas que se deben especificar cuando se dan los valores de actividad [30].

Existen diferentes métodos para la determinación de la actividad de una enzima, el método aplicado está dado por el sustrato y mecanismo de acción que tenga la enzima.

Las relaciones entre los ensayos no son fuertes, por lo que es difícil comparar directamente las actividades de las enzimas. La misma enzima puede mostrar diferentes resultados de actividad en condiciones de pH y temperatura óptimos dependiendo del sustrato. Los métodos usados son el ensayo de coágulo de la leche, el cual se basa en una determinación subjetiva del tiempo de coagulación, y aquellos métodos que proporcionan resultados utilizando un espectrofotómetro [31].

De acuerdo a Enzyme Development Corporation, los métodos de ensayo de actividad que pueden ser aplicados para determinar la actividad de la bromelina debido a su naturaleza cisteineo-proteasa son:

- **Unidad de Digestión de Gelatina (GDU):** Una Unidad de Digestión de Gelatina es la cantidad de enzima que liberará, después de 20 minutos de digestión a 45°C y pH 4.5 o 5.5, 1 mg de nitrógeno amino de una solución estándar de gelatina [32].

- **Unidad de Digestión de Tirosina (TU/ml):** Se basa en degradación de la caseína a pH 6 y 40°C por 1 hora, teniendo como resultado L-tirosina la cual se lee a 280 nm en el espectrofotómetro, aunque este método se utiliza principalmente para papaína por ser una enzima cisteínica también es utilizada para medir la actividad proteolítica de la bromelina. Una Unidad de Tirosina es definida como la cantidad de enzima que actuando en un sustrato específico de caseína a condiciones específicas, produce 1 µg de tirosina por minuto [32].

- **Unidad de Digestión de Caseína (CDU):** Se basa en la degradación del sustrato de caseína a pH 7 y 37°C, teniendo como resultado L-tirosina en el medio degradado, aminoácido que puede ser identificado fácilmente a 280 nm

en el espectrofotómetro. Una Unidad de Caseína (CDU) es definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μg de L-tirosina luego de un minuto de digestión de caseína estándar como sustrato a pH 7 y 37°C [32].

- **Unidad de Coagulación de Leche (MCU/mg):** Se basa en la hidrólisis proteolítica de un sustrato de leche tamponada a 40°C, la actividad enzimática está relacionada con el tiempo requerido para coagular 25 ml de sustrato. La actividad enzimática se compara siempre con una enzima estándar. [32].

- **Método Analítico de Plantas Proteolíticas (Unidades de Papaína, UP):** Este método es utilizado para enzimas como la papaína, bromelina y ficina, el ensayo se basa en una hidrólisis de caseína por 60 minutos a 40°C y pH 6. La Unidad de Papaína es el equivalente a 1 mg de tirosina por una hora bajo este ensayo [32].

En los estudios de investigación realizados para determinación de la actividad enzimática de la bromelina, el método más utilizado es el

de Unidades de Tirosina, por lo que para efectos comparativos en el presente trabajo se usó el mismo procedimiento.

Otra unidad comúnmente usada es la actividad específica, la cual se refiere a la actividad de una enzima por miligramo de proteína y suele expresarse en $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ o U/mg . La actividad específica nos permite tener una idea de la pureza de la enzima [30].

1.6. Liofilización de enzimas

La liofilización es un proceso de deshidratación de productos bajo baja presión (vacío) y moderada temperatura. En la liofilización no ocurre la evaporación del agua a partir del estado líquido - normal en procesos de secados - sino la sublimación del hielo. Por este motivo los productos deben permanecer obligatoriamente solidificados (congelados) durante el secado [33]. La aplicación de la liofilización constituye un efectivo sistema de preservación de elementos biológicos como células, enzimas, virus, levaduras, algas y alimentos en general. Todos estos materiales contienen sustancias volátiles que no se ven afectas por este proceso ya que se trabaja a bajas temperaturas, no existen daños por altas

temperaturas como en el secado, mantiene la estructura fisicoquímica del producto, y la rehidratación es completa y rápida [34].

El material resultante se presentará seco, pero con todas las características del producto original - forma, color, aroma, sabor y textura estarán preservados en el producto seco. Eso diferencia y destaca el proceso de liofilización de los otros utilizados en deshidrataciones [33].

La liofilización se basa en el desecado por medio de la sublimación del agua contenida en los productos, se logra congelando el producto y se remueve el hielo aplicando calor en condiciones de vacío, de esta manera el hielo se sublima evitando el paso por la fase líquida. Para que se de este proceso de sublimación es necesario que el cambio se produzca en condiciones de presión y temperatura menores a las del punto triple (punto en el que conviven los tres estados de la materia), ya que por debajo de éste no existe la fase líquida [34]. En la Figura 1.7 del diagrama de fase de los estados de la materia se puede observar la ubicación del punto triple.

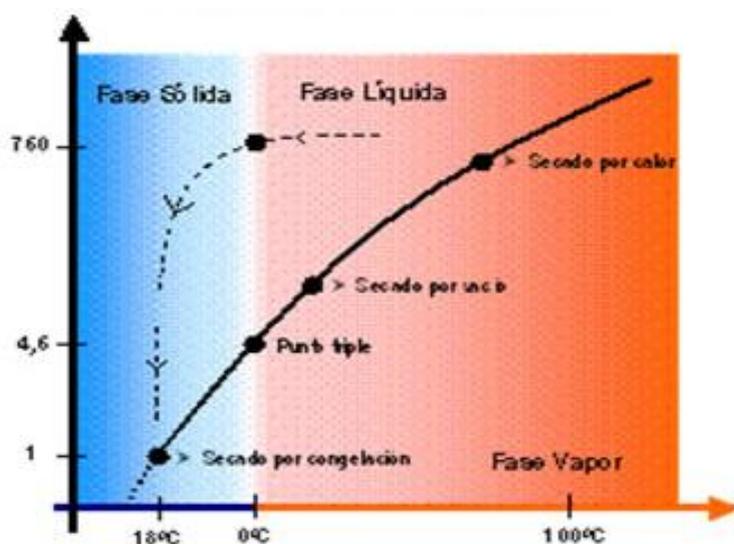


Figura 1.7. Diagrama de Fase

Fuente: Referencia [35]

La liofilización consta de 4 procesos:

1. **Preparación:** Se refiere al acondicionamiento de la muestra ya que en el proceso no se puede manipular [34].

2. **Congelación:** Se lleva a cabo en congeladores independientes para congelar el agua libre del producto a temperatura de -20°C [34]. Sin embargo, si contienen ácidos fuertes, azúcares o grasas deberán ser congelados en médium ultra freezers (-40°C), ultra

freezer, hielo seco (-80°C) o hasta en nitrógeno líquido (-190°C) [33].

La congelación puede ser lenta o rápida dependiendo de lo que se vaya a liofilizar, una congelación rápida favorecerá a las sustancias líquidas ya que los cristales grandes ayudan a la formación de canales que favorecen el movimiento del vapor de agua, mientras que los cristales pequeños favorecen a las sustancias sólidas debido a que evitan la ruptura de membranas; muchas veces los cristales de menor tamaño dificultan el flujo del vapor de agua [33].

- 3. Desecación primaria:** Consiste en la sublimación del solvente congelado en la mayoría de casos el agua, para lo que es necesario la reducción de la presión en la cámara junto con el aumento de la temperatura del equipo liofilizador, dándose la transferencia de calor por conducción y radiación. Al inicio de esta tercera etapa, el hielo sublima desde la superficie del producto y a medida que avanza el proceso, el nivel de sublimación retrocede dentro de él, teniendo entonces que pasar el vapor por capas ya secas para salir del producto. Este vapor, se recoge en la superficie del condensador, el

cual debe tener suficiente capacidad de enfriamiento para condensarlo todo, a una temperatura inferior a la del producto [34].

En la figura 1.8 se observa la representación de la pérdida de agua que se da en la muestra, y por qué es necesario que se formen poros adecuados y permeables a los vapores.



Figura 1.8. Superficie de sublimación (seca) profundizando en la pastilla congelada

Fuente: Referencia [33]

- 4. Desecación secundaria:** Consiste en la eliminación del agua ligada por medio de la desorción, logrando que el porcentaje de humedad final sea menor al 2%. Sin embargo, en esta etapa la presión disminuye al mínimo, por lo que se realiza a la máxima capacidad de vacío que pueda alcanzar el equipo. Es importante,

finalmente, controlar el contenido final de humedad del producto, de manera que se pueda garantizar su estabilidad [34].

1.7. Aplicación de la Bromelina en la industria

En la industria de alimentos la bromelina tiene aplicación en las cervecerías donde es utilizada para la clarificación y el enfriamiento de la cerveza [19, 21], en la industria del cuero se utiliza en el aprovechamiento de las virutas del cuero para la transformación a colágeno [19], en la industria cárnica se utiliza en el proceso de maceración de la carne para su tenderización [19, 37, 42], en el tratamiento de pescados y otros productos marinos como la producción de salsas de ostras [21]; en la fabricación de galletas para la eliminación del gluten [21]; como sustituto de los sulfitos empleados para impedir el pardeamiento de los jugos de frutos y del vino blanco [21].

La aplicación de la Bromelina está siendo ampliamente investigada en el área de la medicina por sus innumerables ventajas en la salud, puede llegar a reducir tiempos de cicatrización, es usada en el tratamiento para la sinusitis, tratamiento para

quemaduras de segundo y tercer grado; se ha demostrado mediante estudios en personas que sufrieron infartos de miocardio que inhibe la agregación de plaquetas [36].

Muestra varias acciones farmacológicas, se ha usado en enfermedades virales y en la formulación de vacunas, presenta propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas y fibrinolíticas, se ha demostrado además la posible actividad antitumoral al inducir la diferenciación de células tumorales y atenuar el crecimiento del tumor [37, 42]. Se demostró una marcada actividad antitumoral frente a cinco tumores trasplantables a ratones: leucemia P-388, carcinoma pulmonar de Lewis, sarcoma-37, tumor ascítico de Ehrlich y adenocarcinoma mamario-755, frente a este último se demostró por primera vez la actividad antitumoral de la bromelina [37].

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de este trabajo de investigación se realizaron pruebas experimentales en los laboratorios de Biología Molecular y Bioproductos del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), además de los laboratorios de Bromatología e Investigación y Desarrollo de Productos de la Carrera de Ingeniería en Alimentos, perteneciente a la Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción.

Los datos recopilados fueron procesados mediante el software estadístico en español Minitab 15.0.

2.1. Materiales, Reactivos y Equipos

Materia prima

Se usó piñas las cuales fueron obtenidas de una hacienda ubicada en el sector El Congo vía El Empalme, provincia del Guayas, cuyo estado fisiológico de madurez para el estudio fueron 12 y 18 meses.

Reactivos

Para la medición de la acidez se utilizó, hidróxido de sodio a 0.1N y como indicador Fenoftaleina Para la extracción de la enzima cruda se utilizó EDTA, fosfato disódicoanhídrido grado analítico y cisteína. En la purificación de la enzima se usó Polietilenglicol PEG 8000, fosfato de potasio monobásico y fosfato de potasio dibásico. Para la medición de la concentración de proteína se utilizó reactivo de Bradford, además para la curva de calibración del método se usó albúmina sérica bovina.

En la medición de la actividad enzimática se utilizó caseína de leche bovina como sustrato, para la preparación de la enzima y el sustrato se usó fosfato disódico anhídrido grado analítico, ácido cítrico monohidratado, L-cisteína para fines bioquímicos, EDTA grado analítico y ácido tricloroacético grado analítico. Para la curva de calibración del método se utilizó L-tirosina para fines bioquímicos y ácido clorhídrico 0.1 N grado analítico.

Equipos

La extracción del jugo de la pulpa de piña se realizó en un extractor. Para la medición de los sólidos solubles se utilizó un refractómetro digital marca Sper SCIENTIFIC. El pH se midió en un pHmetro marca Thermo SCIENTIFIC, Alemania. Para la extracción y purificación de la enzima se utilizó una centrífuga refrigerada marca ThermoFisher SCIENTIFIC, Alemania. Para el peso de los reactivos se usó una balanza analítica KERN, Alemania. Las mediciones de concentración y de actividad se llevaron a cabo en un espectrofotómetro de haz de luz simple marca SpectronicGenesis 5. El proceso de centrifugación para la medición de actividad enzimática se llevó a cabo en una micro centrífuga marca Eppendorf 5424, Alemania; para el baño María se utilizó un equipo

digital marca VWR SCIENTIFICS; además se utilizó micropipetas de 10, 100, 200 y 1000 μ l con puntas desechables y tubos eppendorf de 2 ml. La agitación de los tubos para la medición de la concentración y el procedimiento del sistema bifásico acuoso, fue realizada en un vórtex marca Labnet VX100. El proceso de liofilización se realizó en un liofilizador Freezone 4.5 marca Labconco, Brasil. La humedad de la enzima liofilizada se midió en una termobalanza marca Ohaus MB 45.

2.2. Preparación de reactivos

2.2.1. Buffer de extracción

Las cantidades y los reactivos a utilizar en el buffer de extracción se presentan en la Tabla 5.

El pH de la solución (pH=7) fue ajustado con ácido clorhídrico concentrado (2.15 ml), reactivo del Laboratorio de Bioproductos.

TABLA 5

PESOS DE REACTIVOS EN BUFFER DE EXTRACCIÓN

Reactivo	Peso (g)
Fosfato disódico anhídrido (Na_2HPO_4)	14.20
L-Cisteína ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$)	2.5
EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$)	0.58

Elaborado por: Diana Coello & Juleen Hidalgo, 2013

2.2.2. Reactivos del método de purificación-Sistema Bifásico

Acuoso

Preparación de la fase 1 (polímero 50% p/p)

Se pesó 50 gramos del PEG 8000 y se disolvieron en 50 gramos de agua destilada.

Preparación de la fase 2 (sal fosfato 40% p/p)

Se pesó 1.67 gramos de fosfato de potasio monobásico y 38.33 gramos fosfato de potasio dibásico, se disolvieron en 60 gramos de agua destilada. Se verificó que el pH de la solución sea de 9.

2.2.3. Reactivos para la medición de actividad

Los reactivos para la medición enzimática se prepararon de acuerdo al Método de Unidad de Tirosina de la Enzyme Development Corporation (Ver Apéndice N).

2.3. Metodología experimental

2.3.1. Diseño de Experimento

Determinación de las variables y niveles para la prueba experimental

Para conocer la influencia de los grados de la madurez en la actividad y la concentración enzimática de la bromelina, se planteó un contraste de hipótesis.

H_0 : La concentración y la actividad de la enzima bromelina extraída de la pulpa de la piña (*Ananas comosus*) variedad Perolera, se ve afectada por el estado fisiológico de la piña.

vs

H_1 : $\neg H_0$

El experimento consta de una variable independiente que es la madurez de la piña, los niveles de dicha variable son dos: 12 y 18 meses de maduración.

Las variables dependientes o variables de respuesta de los experimentos fueron la concentración y la actividad enzimática.

Las variables fijas o controladas dentro del experimento fueron la temperatura, las concentraciones y el pH de los reactivos usados.

Determinación del tamaño muestral

El tamaño muestral en la experimentación se determina con la finalidad de obtener el número de muestras necesarias para que la data tenga suficiente soporte estadístico, y nos permita concluir con una menor probabilidad error.

Para esto se realizó una prueba piloto tomando una muestra de cinco piñas totalmente aleatorizadas, donde se midió el parámetro menos sensible de la prueba siendo éste la concentración proteica del extracto crudo, obteniendo los datos que se muestran en la Tabla 6.

TABLA 6

DATOS DE LA PRUEBA PILOTO

Absorbancia	Concentración
0.364	0.15
0.432	0.18
0.876	0.34
0.980	0.39
0.880	0.34

Elaborado por: Diana Coello & Juleen Hidalgo, 2013

Los datos obtenidos fueron procesados estadísticamente para determinar la normalidad de los mismos. En el figura 2.1 se observa que la prueba de normalidad da un valor P mayor a 0.1 (valor $P=0.125$) por lo tanto se confirma la distribución normal de los datos.

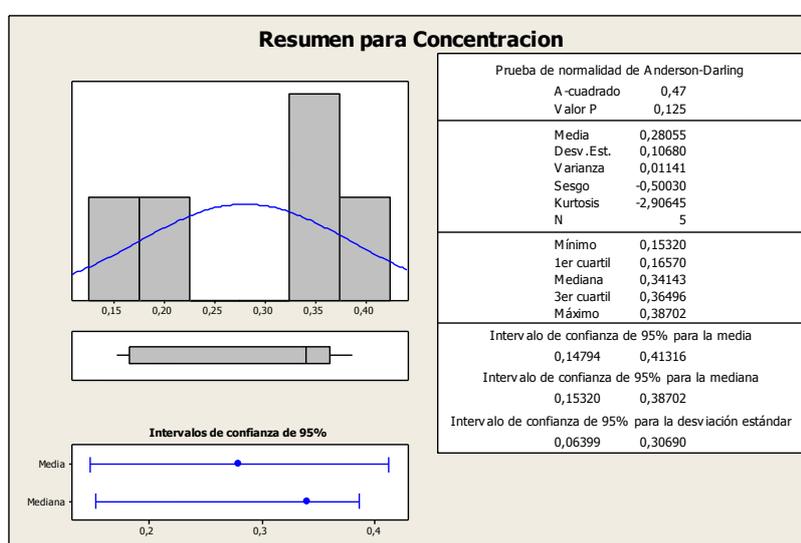


Figura 2.1. Resumen gráfico de la prueba piloto

Fuente: Minitab 15

Una vez comprobada la normalidad de los datos se utilizó el método de Montgomery [38], el cual trata de reducir la probabilidad de cometer error tipo II (no rechazar H_0 siendo falsa).

El método consiste en realizar un tanteo hasta conseguir un Beta (β) máximo de 0.20 utilizando la carta VII (ver Apéndice B), a la cual se ingresa con " Θ ", el cual es calculado mediante la Ecuación 1.

$$\Theta^2 = \frac{n \sum_{i=1}^a \tau_i^2}{a\sigma^2} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde,

n: Tamaño de muestra del experimento

τ_i : Error muestral ($i = 1, \dots, a$)

a: Tamaño muestral de la prueba

σ^2 : Varianza del error

A fin de obtener una prueba con la potencia requerida se realizó el tanteo (ver Apéndice A), dando como resultado un $n=4$ con $\beta=0.15$.

Se corroboró el tanteo del método de Montgomery con la prueba de potencia de Anova unidireccional del programa

estadístico Minitab 15, el cual dio como resultado los valores de n posibles para la prueba, los cuales fueron 4 ($\beta=0.19$) y 5 ($\beta=0.1$), como se puede observar en la Figura 2.2.

Al ser posible realizar un muestreo de 4 o 5 piñas para cada tratamiento con un β que está dentro del valor permitido ($\beta < 0.20$), se estableció que el valor conveniente para el tamaño muestral es $n=4$.

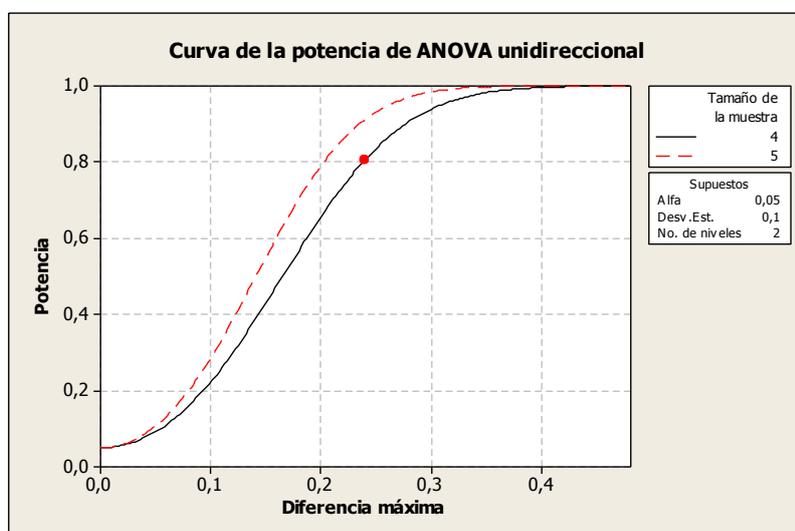


Figura 2.2. Prueba de Anova Unidireccional

Fuente: Minitab 15

2.3.2. Medición de las características físico-químicas de la piña

Para lograr establecer una relación entre el tiempo de cosecha y el estado de madurez de la piña, se caracterizó la fruta utilizando los parámetros y métodos de análisis descritos a continuación:

Peso.- Método gravimétrico que consistió en tomar la lectura del peso de las piñas a partir de los valores indicados en la balanza.

pH.- Se efectuó la lectura en el pHmetro, previo enjuague con agua destilada y calibración del mismo, para lo cual se usó el buffer pH 7 y 4.

Grados Brix.- Se colocó una gota de la muestra en el refractómetro previa calibración del equipo con agua destilada, se realizó la lectura a 25°C y se expresó como grados Brix.

Acidez.- Se determinó por el método del AOAC 939.05 (2000), el cual consistió en diluir la muestra con agua destilada en una relación 1:1, se realizó la determinación por titulación con una solución de hidróxido de sodio 0.1 N usando 4 gotas del indicador fenolftaleína. La acidez titulable se expresó en porcentaje de ácido cítrico, calculada por medio de la Ecuación 2.

$$\% \text{ acidez} = \frac{V_{NaOH} * N_{NaOH} * meq_{\text{ácido}} * 100}{V} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde:

V_{NaOH} : Volumen de NaOH

N_{NaOH} : Normalidad del NaOH

$meq_{\text{ácido}}$: Miliequivalente de ácido (ácido cítrico=0.064)

V : Volumen de la muestra

Ratio.- Se estableció el grado de madurez de la fruta en base a la cantidad de partes de azúcar (como porcentaje de sólidos solubles) en una parte ácida (como porcentaje total de ácido).

2.3.3. Método de extracción enzimática

La extracción enzimática se realizó para obtener la enzima en condiciones adecuadas y evitar su posible oxidación, mediante el uso del buffer de extracción, de acuerdo al estudio realizado por Ketnawa y col (2011) [41].

1. Las muestras se obtuvieron de la pulpa de la piña una vez pelada y cortada (Figura 2.3.a).
2. El jugo de la pulpa se obtuvo con el extractor a temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$), como se ve en la figura 2.3.b.
3. Luego se adicionó el buffer de extracción a 4°C (0.1M tampón fosfato, 15mM de cisteína y EDTA 2mM, pH 7) en una relación 1:1 (v/v).
4. La mezcla fue filtrada a través de una malla para eliminar las fibras presentes.

5. El líquido recolectado se centrifugó a 8000 rpm por 30 minutos a 4°C. (Figura 2.3.c).

6. El sobrenadante (extracto crudo) fue recolectado y almacenado a -18°C para su posterior uso (Figura 2.3.d).

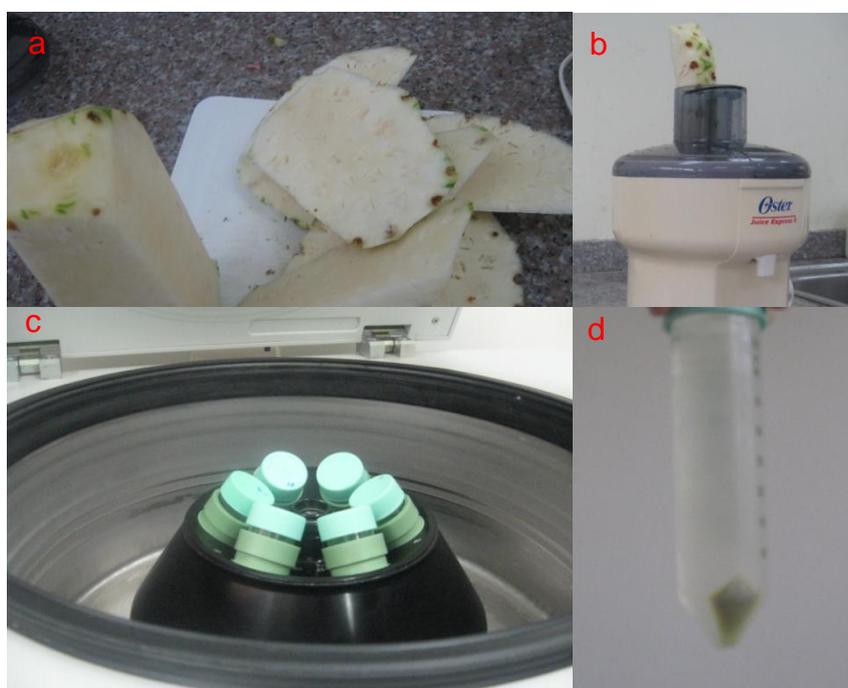


Figura 2.3. Método de Extracción

Elaborado por: Diana Coello & Juleen Hidalgo, 2013

2.3.4. Método de purificación - Sistema Bifásico Acuoso

El sistema fue preparado a partir de las soluciones PEG y fosfato, las concentraciones adecuadas de ambos reactivos en el sistema para obtener un mayor índice de purificación fueron determinadas a partir del estudio realizado por Quinde & Sánchez (2013).

1. Se pesó en un tubo de centrífuga de 50 ml las cantidades requeridas para las fases del sistema (18% PEG 8000; 16% de fosfato de potasio, 46% de agua destilada). Cada reactivo fue agregado tratando de no molestar al anterior.
2. Se agitó en un vórtex por 45 segundos.
3. Se agregó 20% del extracto crudo de enzima.
4. Se agitó nuevamente el sistema por 20 segundos.

5. Inmediatamente se procedió a centrifugar a 8000 rpm por 10 minutos.
6. Después de 2 horas, la fase superior (fase top) se removi6 usando una jeringa, y con ayuda de otra jeringa se removi6 la fase inferior.
7. Se coloc6 cada fase en tubos diferentes y se almacen6 a 4°C para su posterior utilizaci6n.

En la Figura 2.4 se puede observar la separaci6n de fases, pasadas las 2 horas luego de la centrifugaci6n.



Figura 2.4. Separaci6n del Sistema Bif6sico Acuoso
Elaborado por: Diana Coello & Juleen Hidalgo, 2013

2.3.5. Determinación de la cantidad de proteína

Para la determinación de la cantidad de proteína se utilizó el método descrito por Bradford en 1976, para lo cual fue necesario realizar una recta de calibración de la reacción (ver Apéndice H), misma que fue obtenida de la siguiente manera:

1. Se colocaron en 6 tubos de ensayo los volúmenes de la solución patrón de albúmina de suero bovino (BSA 1mg/ml) y de agua destilada mencionados en Tabla 7.

TABLA 7
VOLÚMENES DE LA SOLUCIÓN PATRÓN BSA Y AGUA
DESTILADA

Tubo (Nº)	Solución patrón BSA (ul)	Agua destilada (ul)
1	0	300
2	10	290
3	20	280
4	30	270
5	40	260
6	50	250
7	60	240

Elaborado por: Diana Coello & Juleen Hidalgo, 2013

2. A cada tubo se le añadió 3 ml de reactivo de Bradford.
3. Las muestras fueron agitadas en el vórtex para homogenizarlas.
4. Se esperó 10 minutos para que se establezca el complejo Bradford-proteínas.
5. Se realizó la lectura de cada uno de los tubos siguiendo los pasos indicados en el apartado “Lectura del espectrofotómetro”.

Preparación de la muestra

Para la medición de la concentración en la muestra extraída de la pulpa de la piña, se realizó el siguiente procedimiento:

1. Se colocó 300 µl del extracto de piña (extracto crudo, purificado o seco) en un tubo de ensayo junto con 3 ml de reactivo de Bradford (Figura 2.5.a).

2. Se agitó en el vórtex para homogenizar la muestra.
3. Se esperó 10 minutos para que se establezca el complejo Bradford-proteínas (Figura 2.5.b).

El blanco se preparó con 300 ul del buffer de extracción, siguiendo el mismo procedimiento.

Se realizó la lectura de cada uno de los tubos siguiendo los pasos indicados en el apartado “Lectura del espectrofotómetro”.

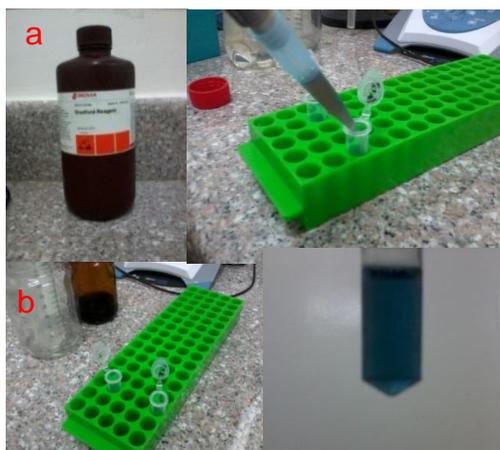


Figura 2.5. Procedimiento de preparación de muestras
Elaborado por: Diana Coello & Juleen Hidalgo, 2013

Lectura del Espectrofotómetro

La lectura del espectrofotómetro se realizó de acuerdo al siguiente procedimiento:

1. Se seleccionó la opción "Set up list".
2. Se eligió la longitud de onda correspondiente a 595 nm (opción 3).
3. Las muestras fueron colocadas en los vasos de cuarzo del espectrofotómetro como se muestra en la Figura 2.6.a.
4. Luego se colocaron los vasos de cuarzo dentro del espectrofotómetro, recordando que la parte más gruesa de los recipientes debe estar en los bordes del soporte (Figura 2.6.b). En la primera celda se colocó el blanco y en las siguientes celdas las muestras objetivos.

5. Se tomó la lectura del blanco y se encendió con el botón “Autozero”.

6. Se realizó la lectura de las respectivas absorbancias.



Figura 2.6. Procedimiento de lectura del espectrofómetro
Elaborado por: Diana Coello & Juleen Hidalgo, 2013

2.3.6. Determinación de la actividad enzimática

Se utilizó el Método Analítico de la Unidad de Tirosina (TU/ml), procedimiento que se detalla en el Apéndice N, con algunas modificaciones.

Para este método fue necesario elaborar una curva de calibración usando una solución madre de L-tirosina y ácido clorhídrico 0.1 N como diluyente.

La solución madre fue elaborada a partir de 100 mg de L-tirosina diluidos con HCl 0.1 N en un matraz aforado de 1 litro.

Para las demás concentraciones de L-tirosina se diluyó diferentes volúmenes de la solución madre en HCl 0.1 N, de acuerdo a los valores indicados en la Tabla 8, para obtener las concentraciones finales de L-tirosina.

TABLA 8
CONCENTRACIONES USADAS PARA LA
ELABORACIÓN DE LA CURVA DE TIROSINA

Concentración Final (ug/ml)	Dilución de la solución madre de L-Tirosina
25	25 ml/100 ml
50	50 ml/100 ml
75	75 ml/100 ml
100	-

Elaborado por: Diana Coello & Juleen Hidalgo, 2013

Se realizó la lectura de las absorbancias a 280 nm para cada una de las soluciones de tirosina, usando HCl 0.1 N para iniciar el espectrofotómetro en cero.

Se realizó la gráfica de absorbancia vs concentración (ver Apéndice K) para determinar la pendiente de la recta, la cual debió estar entre 0.0064 y 0.0076.

Para la medición de la actividad enzimática se preparó una solución de caseína como sustrato, procedimiento de preparación detallado en el Apéndice N.

La Figura 2.7 muestra el procedimiento seguido para la medición de la actividad enzimática.

El proceso se realizó por duplicado, cada paso correspondió a dos pruebas de enzima y un blanco.

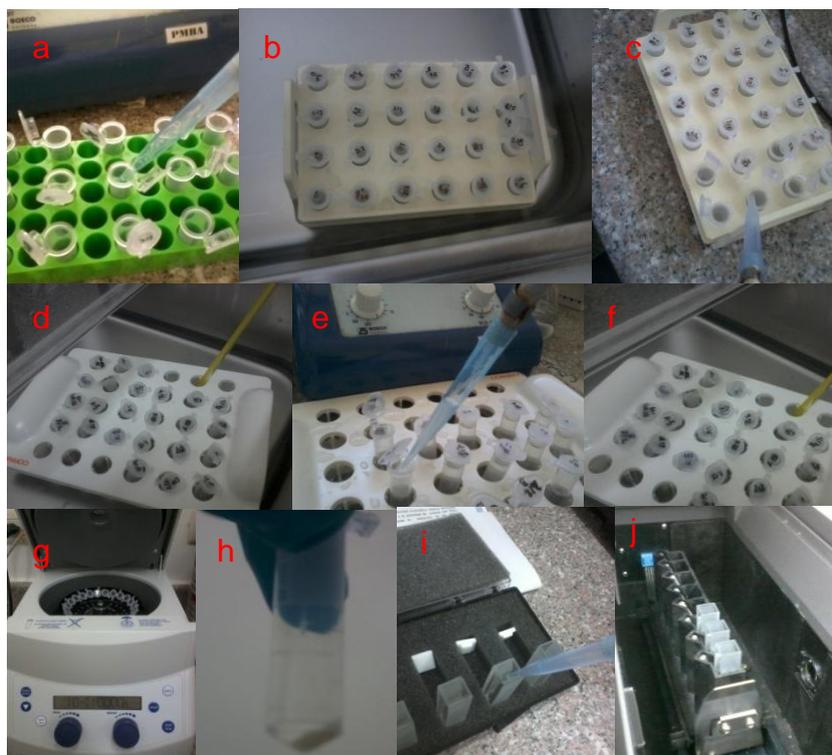


Figura 2.7. Medición de actividad enzimática

Elaborado por: Diana Coello & Juleen Hidalgo, 2013

1. Se colocó 1 ml del sustrato de caseína en 3 tubos eppendorf de 2 ml rotulados, dos para enzima y uno para el blanco, como se observa en la Figura 2.7.a.
2. Se equilibraron los tubos en baño María a 40°C durante 10 minutos (Figura 2.7.b).

3. Luego se colocó 0.4 ml de la enzima a cada tubo, excepto al del blanco, se cerraron los tubos y se invirtieron suavemente varias veces, para mezclarlos (Figura 2.7.c).

4. Se colocaron los tubos en baño maría (40°C) por 60 minutos, para permitir que actúe la enzima (Figura 2.7.d).

5. Luego se añadió a cada tubo 0.6 ml de la solución de TCA, se agitó vigorosamente. Para el blanco se añadió luego del TCA, 0.4 ml de la solución de enzima (Figura 2.7.e).

6. Se regresaron los tubos al baño maría por 30 minutos, para completar la coagulación de la caseína precipitada (Figura 2.7.f).

7. Luego se procedió a centrifugar los tubos a 10000 rcf por 10 minutos, para lograr la separación de los sólidos suspendidos (Figura 2.7.g).

8. El sobrenadante obtenido del centrifugado (Figura 2.7.h), fue colocado en los vasos de cuarzo del espectrofotómetro (Figura 2.7.i), para así poder realizar la lectura de la absorbancia a 280 nm (Figura 2.7.j). Se corrigió el valor de absorbancia de cada muestra, sustrayendo el valor del blanco correspondiente.

Para calcular la actividad enzimática se usó la Ecuación 3.

$$TU/ml = DO_{280} * \frac{V_{total}}{(V_{enzima})(tiempo)} * \frac{1}{pendiente} * FD \quad (Ec. 3)$$

Donde,

TU/ml : Actividad enzimática expresada en unidades de tirosina (TU)

DO_{280} : Densidad óptica medida a 280 nm menos la densidad óptica del blanco

V_{total} : Volumen del sustrato, enzima y reactivo de terminación (TCA)

V_{enzima} : Volumen de la enzima

tiempo: Duración de la hidrólisis en minutos

pendiente: Pendiente obtenida de la curva de tirosina

FD : Factor de dilución (usado cuando los valores de absorbancia dieron valores mayores a 1.5)

El cálculo de la actividad enzimática específica se realizó mediante la Ecuación 4 (Chávez y col, 1990), que define la actividad enzimática por cantidad de proteína presente en el extracto [30].

$$A_{esp} = \frac{AE}{[P]} \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde,

A_{esp} : Actividad enzimática específica expresada en TU/mg de proteína

AE : Actividad enzimática expresada en TU/ml

$[P]$: Concentración de proteína en mg/ml

2.3.7. Liofilización enzimática

Para realizar la liofilización fue necesario primero congelar la muestra a -80°C .

La Figura 2.8 muestra el equipo empleado en el proceso de liofilización.



Figura 2.8. Liofilizador

Elaborado por: Diana Coello & Juleen Hidalgo, 2013

El procedimiento de liofilización se realizó de acuerdo al protocolo del equipo liofilizador Freezone 4.5 marca Labconco, Brasil.

Las condiciones del equipo de liofilización se muestran en la Tabla 9.

TABLA 9

CONDICIONES DEL LIOFILIZADOR

Temperatura (°C)	- 40
Presión (Pa)	$133 \cdot 10^{-3}$

Elaborado por: Diana Coello & Juleen Hidalgo, 2013

CAPÍTULO 3

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1. Análisis de las características de la piña de acuerdo al estado fisiológico

Para el análisis de los resultados obtenidos de los parámetros físico-químicos como peso, pH, °Brix, acidez y ratio, para caracterizar la piña de acuerdo a su estado fisiológico, se muestra a continuación la comparación de cada uno de ellos y se plantearon las hipótesis necesarias para establecer si existía o no diferencia significativa.

Peso

En la Tabla 10 se observa los valores en kilogramos de los pesos que se obtuvieron para las diferentes piñas, teniendo un promedio de 1.45 ± 0.2 Kg para la piña de 12 meses y para la piña de 18 meses un promedio de 2.24 ± 0.45 Kg.

TABLA 10
DATOS EXPERIMENTALES DEL PESO

Madurez (meses)	Peso (Kg)	Promedio (kg)
12	1.60	1.45±0.2
	1.17	
	1.58	
	1.46	
18	2.34	2.24±0.45
	1.61	
	2.67	
	2.32	

Elaborado por: Diana Coello & Juleen Hidalgo, 2013

Se planteó un contraste de hipótesis para determinar si existe o no diferencia significativa entre los valores de los pesos de la piña de acuerdo a su estado de madurez.

H_0 : El peso promedio de la piña de 12 meses es igual al peso promedio de la piña de 18 meses

vs.

$H_1: \neg H_0$

Al presentar ambos grupos de datos una distribución normal (ver Apéndice C) se procedió a usar la prueba Two Sample T, asumiendo que las varianzas poblacionales son iguales (ver Apéndice C), mostrando los resultados de la prueba en la Tabla 11.

TABLA 11
RESULTADOS DE LA PRUEBA T E IC DE DOS MUESTRAS:
PESO. MADUREZ

T de dos muestras para Peso				
Madurez	N	Media	Desviación Estándar	Media del error estándar
12	4	1,452	0,198	0,099
18	4	2,235	0,447	0,22
Diferencia = $\mu(12) - \mu(18)$				
Estimado de la diferencia: -0,782				
IC de 95% para la diferencia: (-1,461. -0,104)				
Prueba T de diferencia = 0 (vs. no =): Valor T = -3,20				
Valor P = 0,033 GL = 4				
Ambos utilizan Desv.Est. agrupada = 0,0417				

Fuente: Minitab 15

Con un valor P menor a 0.1 (valor P = 0.033), se tiene suficiente evidencia estadística para rechazar H_0 a favor de H_1 , es decir que existe diferencia significativa entre el peso promedio de la piña de 12 meses y la de 18 meses, con un nivel de confianza del 95%.

En la Figura 3.1 se puede observar la distribución de los datos mediante un diagrama de cajas, el cual muestra que los valores del peso de la piña de 18 meses son mayores que los valores de la piña de 12 meses, notándose además que los datos están más dispersos en el grupo de 18 meses.

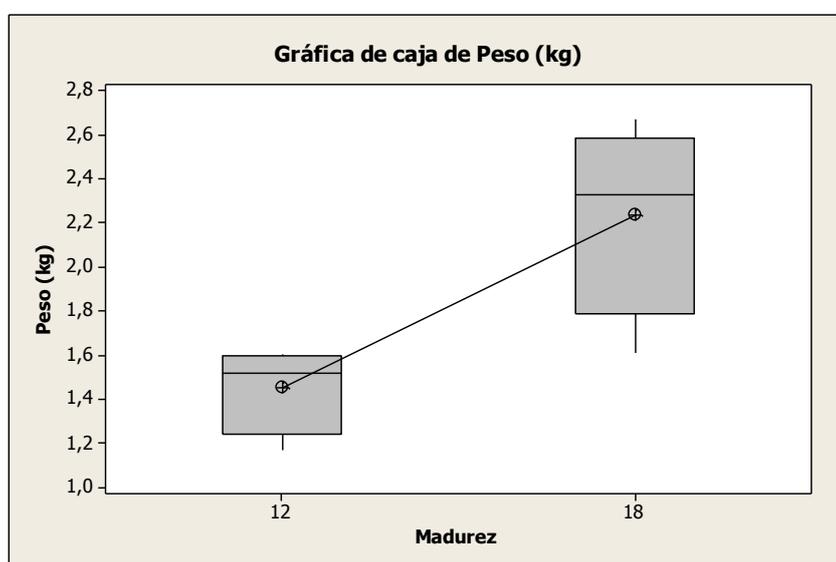


Figura 3.1. Gráfica de Cajas de Peso
Fuente: Minitab 15

pH

En la Tabla 12 se observa los valores de pH que se obtuvieron para las diferentes muestras, teniendo un promedio de 4.14 ± 0.04 para la piña de 12 meses y para la piña de 18 meses un promedio de 4.19 ± 0.04 .

TABLA 12
DATOS EXPERIMENTALES DE pH

Madurez (meses)	pH	Promedio
12	4.09	4.14±0.044
	4.17	
	4.13	
	4.19	
18	4.20	4.19±0.039
	4.16	
	4.17	
	4.25	

Elaborado por: Diana Coello & Juleen Hidalgo, 2013

Se planteó un contraste de hipótesis para determinar si existe o no diferencia significativa entre los valores de pH de la piña de acuerdo a su estado de madurez.

H_0 : El pH promedio de la piña de 12 meses es igual al pH promedio de la piña de 18 meses

vs.

$H_1: \neg H_0$

Al presentar ambos grupos de datos una distribución normal (ver Apéndice D) se procedió a usar la prueba Two Sample T, asumiendo que las varianzas poblacionales son iguales (ver Apéndice D), mostrando los resultados de la prueba en la Tabla 13.

TABLA 13
RESULTADOS DE LA PRUEBA T E IC DE DOS MUESTRAS: PH.
MADUREZ

T de dos muestras para pH				
Madurez	N	Media	Desviación Estándar	Media del error estándar
12	4	4,1425	0,0441	0,022
18	4	4,1925	0,0393	0,020
Diferencia = $\mu(12) - \mu(18)$				
Estimado de la diferencia: -0,0500				
IC de 95% para la diferencia: (-0,1222. 0,0222)				
Prueba T de diferencia = 0 (vs. no =): Valor T = -1,69 Valor P = 0,141 GL = 6				
Ambos utilizan Desv.Est. agrupada = 0,0417				

Fuente: Minitab 15

Con un valor P mayor a 0.1 (valor P = 0.141), se tiene suficiente evidencia estadística para no rechazar H_0 a favor de H_1 , es decir que no existe diferencia significativa entre el pH promedio de la piña de 12 meses y la de 18 meses, con un nivel de confianza del 95%.

En la Figura 3.2 se puede observar la distribución de los datos mediante un diagrama de cajas, el cual muestra que los valores de pH de la piña de 18 meses son más altos que los valores de la piña de 12 meses, sin embargo la diferencia que existe no es significativa.

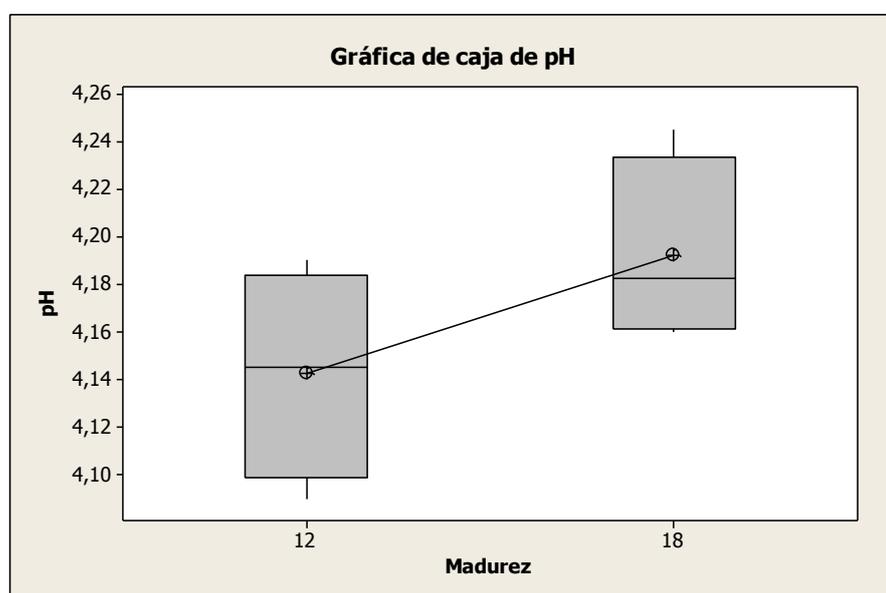


Figura 3.2. Gráfica de Cajas de pH

Fuente: Minitab 15

Grados Brix

La Tabla 14 muestra los valores de sólidos solubles expresados en grados Brix, que se obtuvieron en cada muestra, obteniendo un promedio de 8.64 ± 0.26 °Brix para la piña de 12 meses y para la piña de 18 meses un promedio de 10.03 ± 0.23 °Brix.

TABLA 14
DATOS EXPERIMENTALES DE GRADOS BRUX DE LA PIÑA

Madurez (meses)	°Brix	Promedio
12	8.80	8.64±0.26
	8.75	
	8.25	
	8.75	
18	10.25	10.03±0.23
	10.20	
	9.85	
	9.80	

Elaborado por: Diana Coello & Juleen Hidalgo, 2013

Al no presentar una distribución normal los datos de la piña de 12 meses (ver Apéndice E), se procedió a usar la prueba Mann-Whitney para realizar un contraste de hipótesis en el cual se

compararon las medianas de los grupos, para determinar si existía o no diferencia significativa entre ellas.

H_0 : La mediana del °Brix de la piña de 12 meses es igual a la de 18 meses

vs.

H_1 : $\neg H_0$

TABLA 15
RESULTADOS DE LA PRUEBA DE MANN-WHITNEY E IC: BRIX.
MADUREZ

Madurez	N	Mediana
12	4	8,750
18	4	10,025
Estimación del punto para ETA1-ETA2 es -1,450		
97,0 El porcentaje IC es (-2,000.-1,000)		
W = 10,0		
Prueba de ETA1 = ETA2 vs. ETA1 no es = ETA2 es significativa en 0,0304		
La prueba es significativa en 0,0294 (ajustado por empates)		

Fuente: Minitab 15

En la Tabla 15 se observan los resultados de la prueba, la cual dio un valor P menor a 0.05 (valor P=0.0294) por lo tanto hay suficiente

evidencia estadística para rechazar H_0 a favor de H_1 , es decir que la mediana del °Brix de las piñas de 12 y 18 meses no son iguales, con un nivel de confianza del 97%.

Como se puede observar en la Figura 3.3, los datos de los grados Brix de las piñas de 12 y 18 meses se encuentran claramente distanciados, además se puede ver que en los datos del grupo de 18 meses la data está distribuida más uniformemente, mientras que en el grupo de 12 meses los datos hasta la mediana (el 50%) se encuentran con una gran dispersión.

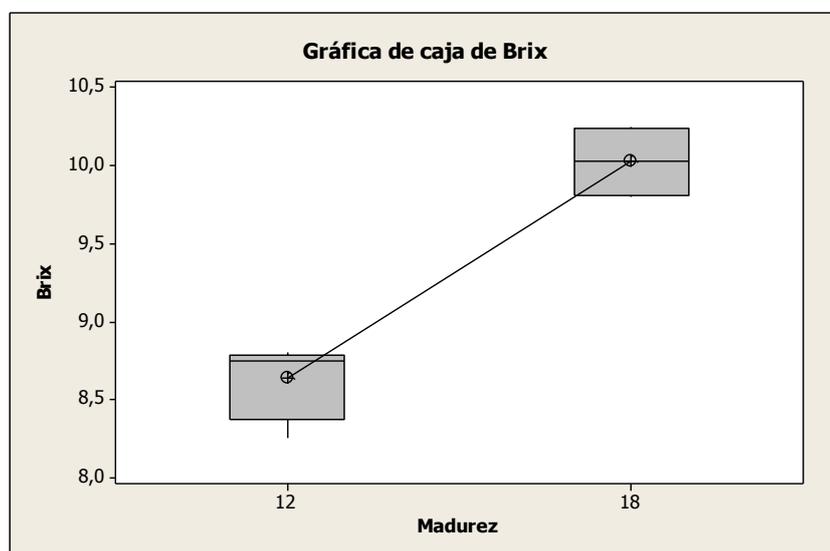


Figura 3.3. Gráfica de caja de Brix

Fuente: Minitab 15

Un comportamiento similar de los valores de °Brix se pudieron observar en el estudio de maduración de la piña realizado por Morales y col. (2001), en donde incrementaban los °Brix al aumentar el tiempo de maduración de la fruta, además en la maduración de los frutos uno de los cambios más importante es la degradación de los carbohidratos poliméricos, como el almidón, el cual se convierte en su mayoría en azúcares simples (Wills y col., 1990) [39].

Acidez

En la Tabla 16 se presentan los datos de acidez calculados para cada uno de los estados de madurez de la piña, obteniendo un promedio de $0.59 \pm 0.047\%$ para las piñas de 12 meses y $0.63 \pm 0.03\%$ en las piñas de 18 meses.

Se realizó una prueba de hipótesis para determinar estadísticamente si existía o no diferencia significativa entre los promedios obtenidos de la acidez de la piña, dependiendo de su estado de madurez.

TABLA 16

DATOS EXPERIMENTALES DE ACIDEZ DE LA PIÑA

Madurez (meses)	Acidez (% ácido cítrico)	Promedio (% ácido cítrico)
12	0.6048	0.59±0.047
	0.6016	
	0.6400	
	0.5280	
18	0.6688	0.63±0.03
	0.6368	
	0.6176	
	0.5984	

Elaborado por: Diana Coello & Juleen Hidalgo, 2013

H_0 : La acidez promedio de la piña de 12 meses es igual a la acidez promedio de la piña de 18 meses

vs.

H_1 : $\neg H_0$

Los datos presentan una distribución normal (ver Apéndice F) por lo tanto se procedió a usar la prueba Two Sample T asumiendo que las varianzas poblacionales son iguales (ver Apéndice F).

En la Tabla 17 se muestran los resultados obtenidos de la prueba, en el que se observó que no existía suficiente evidencia estadística

para rechazar H_0 a favor de H_1 , ya que el valor P fue mayor a 0.1 (valor $P=0.235$), por lo tanto se concluye que no hay diferencia significativa entre la acidez de la piña de 12 meses y la piña de 18 meses.

TABLA 17
RESULTADOS DE LA PRUEBA T E IC DE DOS MUESTRAS:
ACIDEZ. MADUREZ

T de dos muestras para Acidez				
Madurez	N	Media	Desviación Estándar	Media del error estándar
12	4	0,5936	0,0471	0,024
18	4	0,6304	0,0300	0,015
Diferencia = μ (12) - μ (18)				
Estimado de la diferencia: -0,0368				
IC de 95% para la diferencia: (-0,1051. 0,0315)				
Prueba T de diferencia = 0 (vs. no =): Valor T = -1,32 Valor P = 0,235 GL = 6				
Ambos utilizan Desv.Est. agrupada = 0,0395				

Fuente: Minitab 15

En la Figura 3.4, se puede observar la distribución de los datos, así como la ubicación de los promedios de la acidez, notando que la acidez de la piña de 18 meses es mayor que la de 12 meses, este comportamiento concuerda con lo observado en estudios realizados acerca del estado de madurez de la piña, en los cuales se

menciona que la piña no sigue el comportamiento habitual de demás frutas, ya que por lo general durante la maduración de las frutas sus ácidos orgánicos son convertidos en azúcares para permanecer como una reserva energética, por lo que habría de esperarse que el contenido de ácidos decline; sin embargo en la piña los ácidos alcanzan sus valores más elevados durante la maduración, comportamiento que se observa también en los plátanos (Morales y col., 2001) [39].

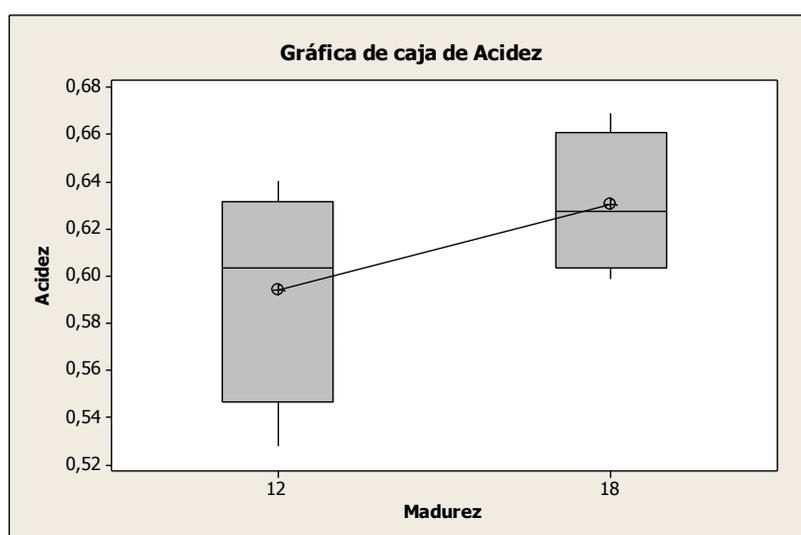


Figura 3.4. Gráfica de caja de Acidez

Fuente: Minitab 15

Estadísticamente no podemos concluir que existe una diferencia significativa entre la acidez de la piña durante los 12 y 18 meses de

maduración, aunque los valores de acidez de la piña de 18 meses son mayores que la de 12.

En un estudio realizado en Bolivia (Rojas, 1991) con la variedad de piña perolera, se observó que el porcentaje de acidez aumentaba conforme lo hacia la escala de madurez de la fruta [40], sin mencionar si la diferencia era estadísticamente significativa.

Ratio

En la Tabla 18 se puede observar los valores del ratio de la piña dependiendo del estado de madurez de la misma, la piña de 12 meses tuvo un ratio promedio de 14.64 ± 1.51 , mientras que la piña de 18 meses tuvo un ratio promedio de 15.92 ± 0.44 .

Para determinar si existía o no diferencia estadísticamente significativa entre los ratios de la piña dependiendo de su estado fisiológico, se estableció un contraste de hipótesis para el promedio de los ratios.

TABLA 18

DATOS DEL RATIO DE LA PIÑA

Madurez (meses)	Ratio	Promedio
12	14,55	14.64±1.51
	14,54	
	12,89	
	16,57	
18	15,33	15.92±0.44
	16,02	
	15,95	
	16,38	

Elaborado por: Diana Coello & Juleen Hidalgo, 2013

H_0 : El ratio promedio de la piña de 12 meses es igual al ratio promedio de la piña de 18 meses

vs.

H_1 : $\neg H_0$

Al presentar los datos una distribución normal (ver Apéndice G), se procedió a usar la prueba Two Sample T, para muestras independientes asumiendo que las varianzas poblacionales son iguales (ver Apéndice G), mostrando los resultados de la prueba en la Tabla 19.

Con un valor P mayor a 0.1 (valor $P=0.154$), existe suficiente evidencia estadística para no rechazar H_0 a favor de H_1 , es decir que en promedio el ratio de la piña de 12 meses es igual al ratio de la piña de 18 meses.

TABLA 19
RESULTADOS DE LA PRUEBA T E IC DE DOS MUESTRAS:
RATIO. MADUREZ

T de dos muestras para Ratio				
Madurez	N	Media	Desviación Estándar	Media del error estándar
12	4	14,64	1,51	0,75
18	4	15,917	0,437	0,22
Diferencia = $\mu(12) - \mu(18)$				
Estimado de la diferencia: -1,278				
IC de 95% para la diferencia: (-3,197. 0,641)				
Prueba T de diferencia = 0 (vs. no =): Valor T = -1,63 Valor P = 0,154 GL = 6				
Ambos utilizan Desv.Est. agrupada = 1,1092				

Fuente: Minitab 15

El valor del ratio establece un índice de madurez en la mayoría de las frutas, pero en el caso de la piña este valor no representa un verdadero indicador del estado de madurez, debido a que en las frutas tropicales ácidas, los ácidos orgánicos como el cítrico, málico,

succínico y propiónico se sintetizan en mayores cantidades hasta llegar al punto óptimo de sazón (Barrera, 2000) [40].

El comportamiento del ratio está estrechamente ligado con la conducta de los grados Brix y la acidez titulable del fruto, es por esto que en el grupo de datos de ambas frutas no se pudo observar una variación significativa, debido a que los valores de grados Brix y acidez aumentan con relación al tiempo, manteniendo la proporcionalidad de los datos. Además, la data de 12 meses presentó una variabilidad mayor a 1 ($\sigma=1,51$), por lo que se obtuvieron valores más cercanos al promedio de los datos de 18 meses.

3.2. Análisis de Concentración proteica

3.2.1. Curva de calibración del método de Bradford

Los datos obtenidos de la lectura del espectrofotómetro para la curva de calibración se muestran en la Tabla 20, con estos datos se graficó la curva de calibración (Figura 3.5),

de la cual se obtuvo la ecuación de la recta que nos permitió determinar la concentración de la enzima.

TABLA 20
RESULTADOS DE LA ABSORBANCIA PARA LA CURVA
DE CALIBRACIÓN DEL MÉTODO DE BRADFORD

Concentración (mg/ml)	Absorbancia
0.033	0.058
0.067	0.132
0.1	0.185
0.167	0.387
0.2	0.514

Elaborado por: Diana Coello & Juleen Hidalgo, 2013

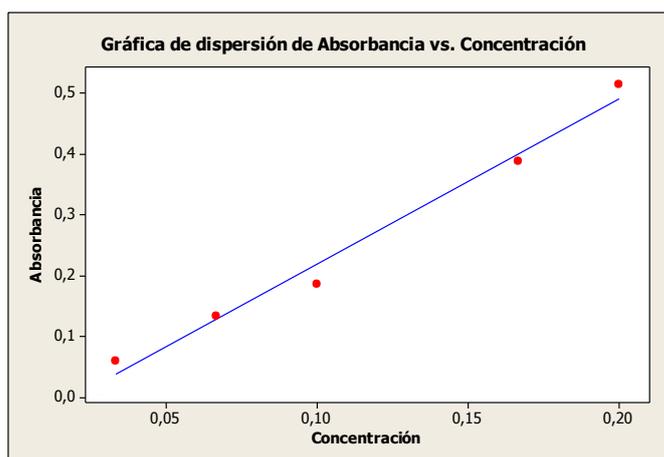


Figura 3.5. Curva de calibración del método de Bradford

Fuente: Minitab15

La ecuación fue obtenida mediante análisis de regresión lineal (ver Apéndice H), el cual dio un valor de R^2 de 98.4% y una pendiente de 2.72.

3.2.2. Concentración proteica en extracto crudo

Los datos de absorbancia para el extracto crudo se muestran en la Tabla 21, así como el valor de la concentración correspondiente a cada absorbancia, dando como resultado una concentración proteica promedio de 0.23 ± 0.24 mg/ml en la piña de 12 meses de maduración y 0.32 ± 0.29 mg/ml en la piña de 18 meses.

Para establecer si existía o no una diferencia entre las concentraciones proteicas de acuerdo a los meses de maduración de la piña, se planteó un contraste de hipótesis para los promedios de la concentración.

TABLA 21
VALORES DE CONCENTRACIÓN PROTEICA EC

Madurez (meses)	Absorbancia promedio	Concentración (mg/ml)	Promedio (mg/ml)
12	0.55	0.22	0.23±0.24
	0.488	0.20	
	0.573	0.23	
	0.647	0.26	
18	0.8815	0.34	0.32±0.29
	0.6945	0.27	
	0.84	0.33	
	0.7935	0.31	

Elaborado por: Diana Coello & Juleen Hidalgo, 2013

H_0 : Las concentraciones proteicas promedios en la piña de 12 y 18 meses son iguales

vs.

H_1 : $\neg H_0$

Al presentar los datos una distribución normal (ver Apéndice I), se procedió a usar la prueba Two Sample T, para muestras independientes asumiendo que las varianzas poblacionales son iguales (ver Apéndice J), mostrando los resultados de la prueba en la Tabla 22.

Con un valor P menor a 0.05 (valor $P=0.004$), existe suficiente evidencia estadística para rechazar H_0 a favor de H_1 , es decir que en promedio la concentración proteica de la piña de 12 meses no es igual a la concentración de la piña de 18 meses. Además, se observó que el intervalo de confianza de la diferencia tiene valores negativos, lo cual indica que el valor más alto en promedio es el de la piña de 18 meses.

TABLA 22
RESULTADOS DE LA PRUEBA T E IC DE DOS
MUESTRAS: CONCENTRACIÓN EC. MADUREZ

T de dos muestras para Concentración EC				
Madurez	N	Media	Desviación Estándar	Media del error estándar
12	4	0,2268	0,0240	0,012
18	4	0,3143	0,0293	0,015
Diferencia = $\mu(12) - \mu(18)$				
Estimado de la diferencia: -0,0875				
IC de 95% para la diferencia: (-0,1338. -0,0412)				
Prueba T de diferencia = 0 (vs. no =): Valor T = -4,62				
Valor P = 0,004 GL = 6				
Ambos utilizan Desv.Est. agrupada = 0,0268				

Fuente: Minitab 15

En la Figura 3.6 del diagrama de cajas de las concentraciones proteicas del EC, se pudo observar que efectivamente los valores de 18 meses son más altos que los de 12 meses.

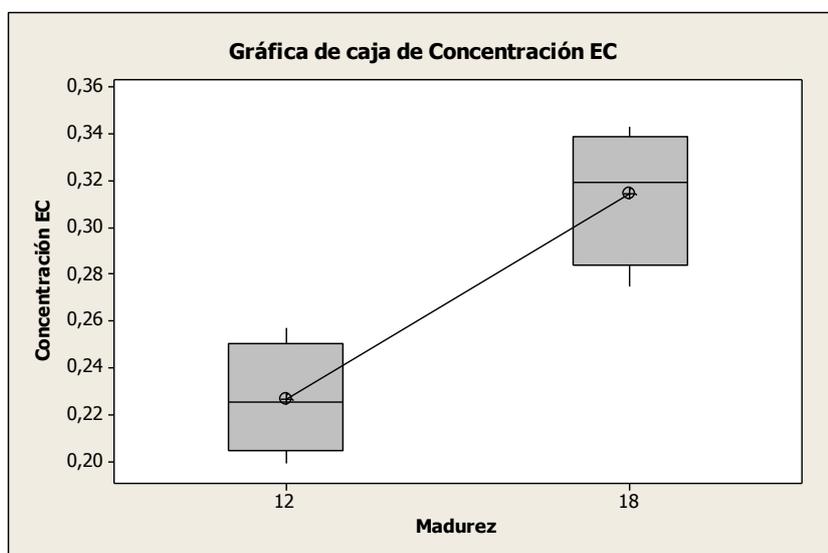


Figura 3.6. Gráfica de cajas de concentración EC

Fuente: Minitab 15

Los valores de concentración proteica obtenidos en el EC son comparables con la investigación publicada en la revista Food Science and Technology International (Ketnawa y col, 2011), en donde se realizaron estudios de extracción de bromelina usando el mismo método de extracción (buffer fosfato pH=7). Los resultados obtenidos

por Ketnawa muestran valores de concentración proteica entre 0.5 y 0.6 mg/ml [41], estos valores resultan mayores a los obtenidos en el presente trabajo debido a que el estudio fue realizado a partir de la cáscara de la piña, la cual muestra concentraciones proteicas mayores comparadas con la pulpa de la fruta, de acuerdo a las investigaciones de Gallardo y col [42].

Otro estudio realizado muestra valores para la concentración media del extracto crudo del fruto igual 0.524 mg/ml [43], correspondiendo a valores similares a los obtenidos en el presente trabajo.

3.2.3. Concentración de enzima purificada

En la Tabla 23, se muestran los datos de absorbancia para la enzima purificada, además del valor correspondiente de la concentración, dando como resultado una concentración promedio de 0.14 ± 0.038 mg/ml de bromelina proveniente de la piña de 12 meses de maduración y 0.2 ± 0.016 mg/ml de bromelina de la piña de 18 meses.

Se realizó una prueba de hipótesis para establecer si existía o no una diferencia entre las concentraciones de bromelina purificada de acuerdo a los meses de maduración de la piña.

TABLA 23
VALORES DE CONCENTRACIÓN ENZIMÁTICA EP

Madurez (meses)	Absorbancia promedio	Concentración (mg/ml)	Promedio (mg/ml)
12	0.335	0.143	0.14±0.038
	0.340	0.144	
	0.175	0.084	
	0.420	0.174	
18	0.536	0.216	0.2±0.016
	0.442	0.182	
	0.510	0.207	
	0.461	0.189	

Elaborado por: Diana Coello & Juleen Hidalgo, 2013

H_0 : Las concentraciones promedios de bromelina purificada en la piña de 12 y 18 meses son iguales

vs.

H_1 : $\neg H_0$

Los datos presentan una distribución normal (ver Apéndice I), por lo tanto se procedió a usar la prueba Two Sample T,

para muestras independientes asumiendo que las varianzas poblacionales son iguales (ver Apéndice J), mostrando los resultados de la prueba en la Tabla 24.

TABLA 24
RESULTADOS DE LA PRUEBA T E IC DE DOS
MUESTRAS: CONCENTRACIÓN EP. MADUREZ

T de dos muestras para Concentración EP				
Madurez	N	Media	Desviación Estándar	Media del error estándar
12	4	0,1362	0,0377	0,019
18	4	0,1985	0,0157	0,0079
Diferencia = μ (12) - μ (18)				
Estimado de la diferencia: -0,0623				
IC de 95% para la diferencia: (-0,1122. -0,0123)				
Prueba T de diferencia = 0 (vs. no =): Valor T = -3,05 Valor P = 0,023 GL = 6				
Ambos utilizan Desv.Est. agrupada = 0,0289				

Fuente: Minitab 15

Con un valor P menor a 0.05 (valor P=0.023), existe suficiente evidencia estadística para rechazar H_0 a favor de H_1 , es decir que en promedio la concentración enzimática de bromelina purificada a partir de la piña de 12 meses no es igual a la concentración enzimática de bromelina

purificada de la piña de 18 meses. Se observa también mediante el intervalo de confianza de la diferencia, que el valor más alto es el de la piña de 18 meses, puesto que el intervalo de confianza de las diferencias presenta valores negativos.

En la Figura 3.7 del diagrama de cajas de las concentraciones enzimáticas, se pudo observar que efectivamente los valores de 18 meses son más altos que los de 12 meses, además de presentar una variabilidad en los datos más pequeña.

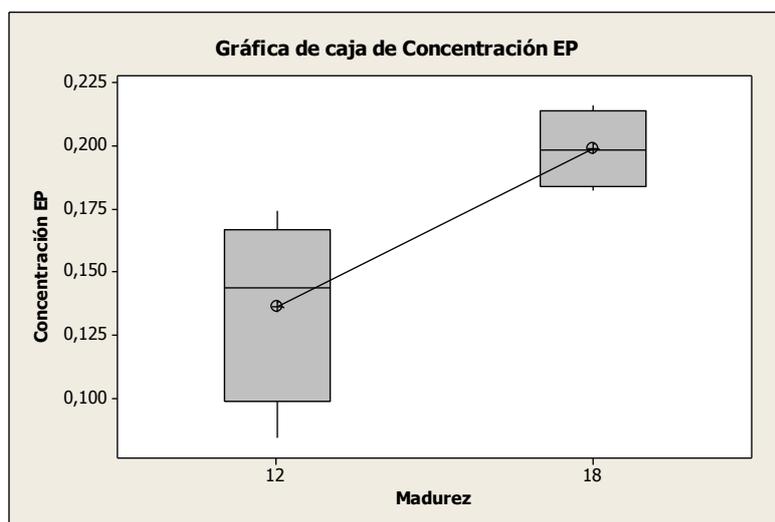


Figura 3.7. Gráfica de cajas de Concentración Purificada

Fuente: Minitab 15

La purificación parcial de la enzima a partir del extracto crudo de la piña logró recuperar concentraciones enzimáticas mayores a 0.1 mg/ml en ambos estados de madurez. El proceso de purificación de la enzima por medio del sistema bifásico acuoso permitió separar la fracción enzimática en la fase top y precipitar la parte no enzimática en la fase bottom.

La disminución de los valores de concentración proteica en el proceso de purificación es un fenómeno que se observó en el estudio realizado por Gautam y col (2010) en donde se purificó bromelina a partir de precipitación con sulfato de amonio, diálisis e intercambio iónico, produciéndose una disminución de la concentración proteica de 1.1 mg/ml del extracto crudo de bromelina de fruta a valores de hasta 0.52 mg/ml [44]. Masdor y Said (2011), realizaron la purificación de la bromelina a partir de cromatografía de intercambio catiónico, obteniendo una disminución de 0.132-0.164 mg/ml de la concentración cruda a 0.09-0.115 mg/ml de enzima purificada, o de 0.172-0.322 mg/ml de extracto crudo a 0.07-0.112 mg/ml de enzima purificada [45]. Soares y col, purificaron la enzima a partir del extracto crudo con

una concentración de 0.201 mg/ml por precipitación con sulfato de amonio, logrando una concentración máxima de 0.089 mg/ml; mientras que en la precipitación con etanol el máximo valor obtenido fue 0.084mg/ml [46].

Relación Concentración enzimática vs. Madurez

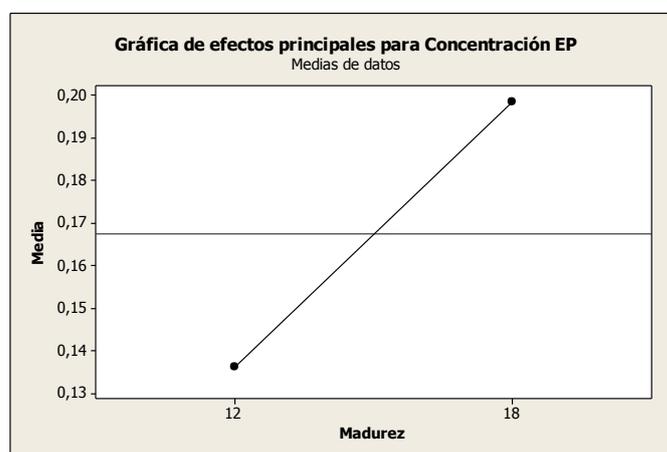


Figura 3.8. Gráfica de interacción entre Concentración Enzimática y Madurez

Fuente: Minitab 15

En la Figura 3.8 podemos observar la relación que existe entre la concentración enzimática de la bromelina en la pulpa de la piña y los meses de madurez de la fruta, teniendo un comportamiento similar al descrito por Heinicke

& Gortner citados en López y col (1996), quienes mencionan que la cantidad de bromelina en la pulpa de la piña aumenta cuando comienza su maduración. En estudios de Omar y col citados en López y col (1996), también se encontró que en las frutas maduras la bromelina es más abundante en comparación con las frutas inmaduras [21].

3.3. Análisis de actividad enzimática

3.3.1. Curva de calibración del método de Unidad de Tirosina

Para la elaboración de la curva de tirosina se tomaron los datos obtenidos de la lectura del espectrofotómetro, que se muestran en la Tabla 25.

En la Figura 3.9 se muestra la curva de calibración, de la cual se obtuvo la ecuación de la recta que nos permitió determinar la pendiente para calcular la actividad enzimática.

TABLA 25

**DATOS DE ABSORBANCIA PARA LA CURVA DE
CALIBRACIÓN DEL MÉTODO DE UNIDAD DE TIROSINA**

Concentración (ug/ml)	Absorbancia
25	0.172
50	0.369
75	0.571
100	0.767

Elaborado por: Diana Coello & Juleen Hidalgo, 2013

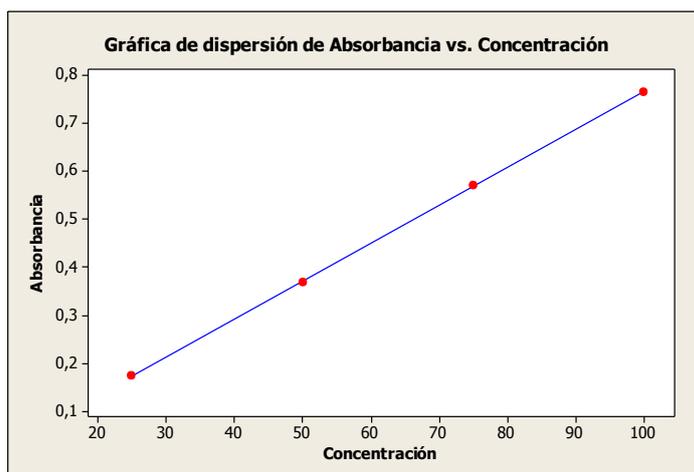


Figura 3.9. Curva de calibración del método de Tirosina

Fuente: Minitab 15

La ecuación fue obtenida mediante análisis de regresión lineal (ver Apéndice K), el cual dio un valor de R^2 de 100% y una pendiente de 0.795.

3.3.2. Actividad enzimática de enzima cruda

En la Tabla 26 se muestran los datos de absorbancia correspondientes a la lectura de la actividad enzimática del extracto crudo, así como el valor correspondiente en TU/ml, dando como resultado una actividad enzimática promedio de 18.29 ± 3.45 TU/ml en la piña de 12 meses de maduración y 10.06 ± 2.82 TU/ml en la piña de 18 meses.

TABLA 26

VALORES DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EC

Madurez (meses)	Absorbancia promedio	Actividad enzimática (TU/ml)	Promedio (TU/ml)
12	1,423	22,43	18.29±3.45
	0,8875	13,99	
	1,173	18,49	
	1,1565	18,23	
18	1,1515	18,15	10.06±2.82
	0,572	9,02	
	0,4515	7,12	
	0,654	10,31	

Elaborado por: Diana Coello & Juleen Hidalgo, 2013

Para establecer si existía o no una diferencia entre las actividades enzimáticas de acuerdo a los meses de

maduración de la piña, se planteó un contraste de hipótesis para sus promedios.

H_0 : En promedio la actividad enzimática de la bromelina del extracto crudo de la piña de 12 meses es igual a la de 18 meses

vs.

$H_1: \neg H_0$

Al presentar los datos una distribución normal (ver Apéndice L), se procedió a usar la prueba Two Sample T, para muestras independientes asumiendo que las varianzas poblacionales son iguales (ver Apéndice M), mostrando los resultados de la prueba en la Tabla 27.

Con un valor P menor a 0.05 (valor $P=0.01$), existe suficiente evidencia estadística para rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo que se concluye que en promedio, la actividad enzimática de la bromelina del extracto crudo de la piña de 12 meses es diferente de la bromelina proveniente de la

piña de 18 meses de maduración, con un nivel de confianza del 95%.

TABLA 27
RESULTADOS DE LA PRUEBA T E IC DE DOS
MUESTRAS: ACTIVIDAD EC. MADUREZ

T de dos muestras para Actividad EC				
Madurez	N	Media	Desviación Estándar	Media del error estándar
12	4	18,28	3,45	1,7
18	4	10,06	2,82	1,4
Diferencia = μ (12) - μ (18)				
Estimado de la diferencia: 8,22				
IC de 95% para la diferencia: (2,77. 13,67)				
Prueba T de diferencia = 0 (vs. no =): Valor T = 3,69 Valor P = 0,010 GL = 6				
Ambos utilizan Desv.Est. agrupada = 3,1518				

Fuente: Minitab 15

Tanto en el diagrama de cajas mostrado en la Figura 3.10 como en el intervalo de confianza de la diferencia de medias de las actividades enzimáticas (Tabla 27), se observa que los valores de actividad de la piña de 12 meses son mayores comparados a los valores de la piña de 18 meses.

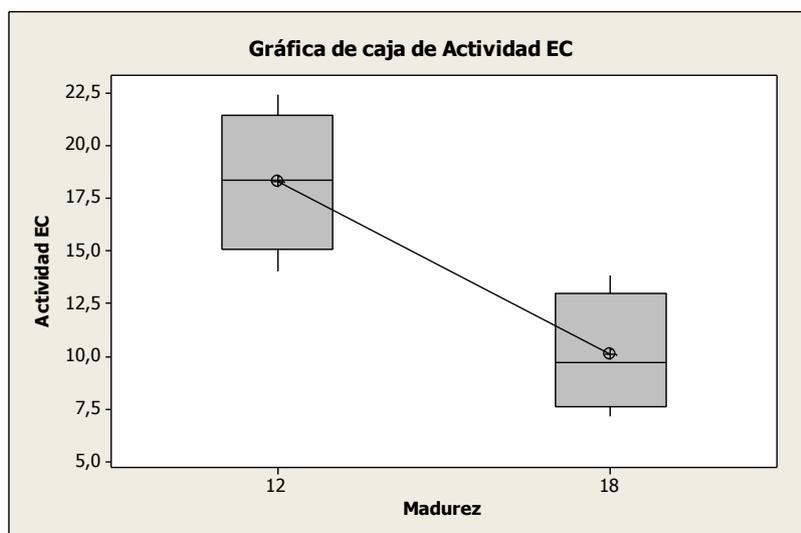


Figura 3.10. Gráfica de cajas de Actividad Cruda

Fuente: Minitab 15

Los valores obtenidos de actividad de extracto crudo son comparables al valor encontrado en el estudio de Soares y col, en donde el extracto crudo muestra una actividad de 16.25 TU/ml [45], además Hernández y col (2005) presentan valores de 14.65 TU/ml para el extracto crudo de enzima [46].

3.3.3. Actividad enzimática de enzima purificada

En la Tabla 28 se muestran los datos de absorbancia correspondientes a la lectura de la actividad enzimática de

la enzima purificada, así como el valor correspondiente en TU/ml, dando como resultado una actividad promedio de 24.23 ± 7.63 TU/ml en la piña de 12 meses de maduración y 13.00 ± 3.18 TU/ml en la piña de 18 meses.

TABLA 28
VALORES DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EP

Madurez	Absorbancia promedio	Actividad enzimática (TU/ml)	Promedio (TU/ml)
12	0.186	19.44	24.23±7.63
	0.219	22.90	
	0.338	35.38	
	0.183	19.18	
18	0.143	14.99	13.00±3.18
	0.082	8.60	
	0.149	15.62	
	0.122	12.79	

Elaborado por: Diana Coello & Juleen Hidalgo, 2013

Para establecer si existía o no una diferencia entre las actividades enzimáticas de la bromelina purificada, de acuerdo a los meses de maduración de la piña, se planteó un contraste de hipótesis para los promedios de la misma.

H_0 : Las actividades enzimáticas promedios de la bromelina en extracto crudo de las piñas de 12 y 18 meses son iguales

vs.

H_1 : $\neg H_0$

Al presentar los datos una distribución normal (ver Apéndice L), se procedió a usar la prueba Two Sample T, para muestras independientes asumiendo que las varianzas poblacionales son iguales (ver Apéndice M), mostrando los resultados de la prueba en la Tabla 29.

Con un valor P menor a 0.05 (valor $P=0.035$), existe suficiente evidencia estadística para rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo que se concluye que en promedio, la actividad enzimática de la bromelina purificada proveniente de la piña de 12 meses es diferente de la bromelina de la piña de 18 meses, con un nivel de confianza del 95%.

TABLA 29
RESULTADOS DE LA PRUEBA T E IC DE DOS
MUESTRAS: ACTIVIDAD EP. MADUREZ

T de dos muestras para Actividad EP				
Madurez	N	Media	Desviación Estándar	Media del error estándar
12	4	24,23	7,62	3,8
18	4	13,00	3,18	1,6
Diferencia = μ (12) - μ (18)				
Estimado de la diferencia: 11,23				
IC de 95% para la diferencia: (1,12. 21,33)				
Prueba T de diferencia = 0 (vs. no =): Valor T = 2,72 Valor P = 0,035 GL = 6				
Ambos utilizan Desv.Est. agrupada = 5,8404				

Fuente: Minitab 15

En el diagrama de cajas mostrado en la Figura 3.11 y en el intervalo de confianza de la diferencia de medias de las actividades enzimáticas mostrado en la Tabla 29, se observa que la piña de 12 meses tiene valores de actividad enzimática mayores comparados a los valores de la piña de 18 meses.

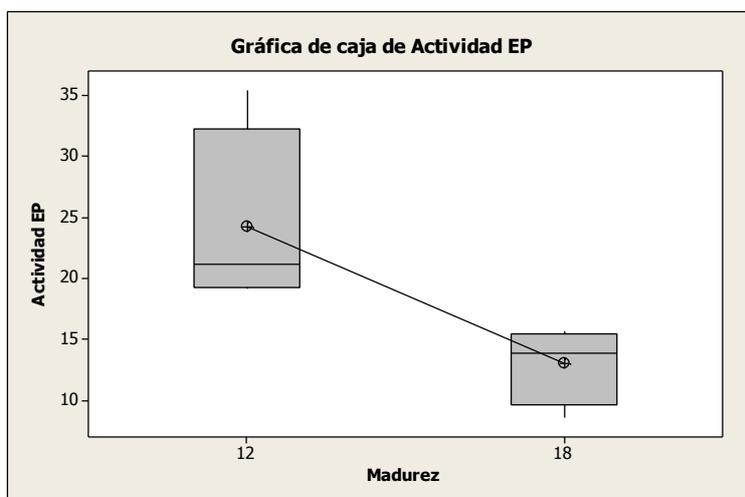


Figura 3.11. Gráfica de Cajas de Actividad Purificada

Fuente: Minitab 15

Además, como se puede observar en la Tabla 30, con el proceso de purificación enzimática se logró recuperar en promedio un 130.21% de actividad enzimática y se tuvo un factor de purificación de 2.16, el cual al ser un valor mayor a 1 hace que el sistema usado resulte satisfactorio, sin embargo existen otras condiciones del SBA que podrían llegar a obtener mayores valores de purificación, como los observados en el estudio realizado en la Universidad Estatal de Campiñas por Diego de Freitas Coelho y col [47], y en el Central Food Technological Research Institute por Ravindra Babu y col [25], los cuales alcanzan valores de hasta 8.5 y 4, respectivamente.

TABLA 30

RESULTADOS DEL SISTEMA DE PURIFICACIÓN

Madurez	Factor de purificación	Rendimiento de actividad enzimática
12	2.32	131.26 %
18	2.00	129.17 %
Promedio	2.16	130.21 %

Elaborado por: Diana Coello & Juleen Hidalgo, 2013

Relación Actividad enzimática vs. Madurez

La relación que existe entre la actividad enzimática de la bromelina proveniente de los dos meses de maduración se puede observar en la Figura 3.12.

En el caso de la actividad enzimática se observó que este valor fue mayor en las frutas de 12 meses de maduración, teniendo aproximadamente el doble de actividad enzimática (24.23 TU/ml) en comparación con la fruta de 18 meses (13 TU/ml), coincidiendo con lo expuesto por Caygill y Etherington citados por López (1996), quienes afirman que la fruta verde presenta aproximadamente el doble de la actividad que la fruta madura [21].

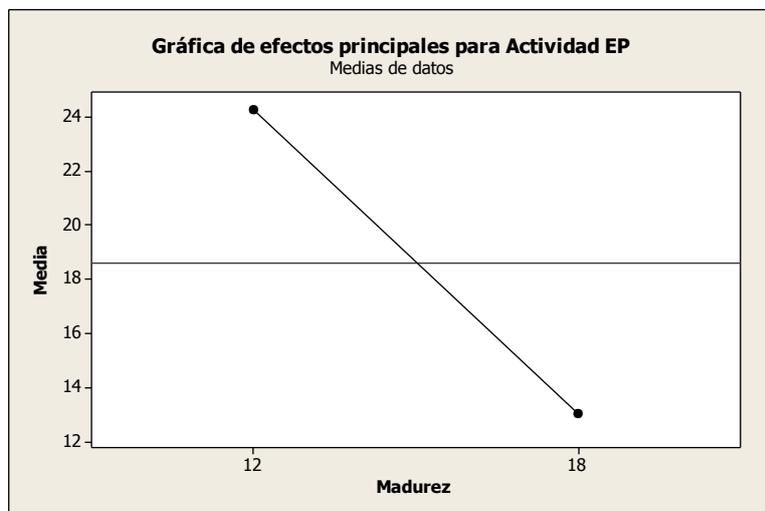


Figura 3.12. Gráfica de interacción entre Actividad Purificada y Madurez

Fuente: Minitab 15

Marcillant citado por López (1996) también encontró en su estudio de la influencia de la madurez de la fruta en la actividad enzimática, que el fruto verde tiene mayor actividad que el fruto maduro, por lo que plantea la hipótesis de que durante la maduración de la fruta se estaría produciendo la síntesis de inhibidores de la enzima [21].

Partiendo del estudio realizado por Murwan y col (2010) acerca de la inhibición de la actividad proteolítica de la piña en presencia de ácido fítico y tanino, en donde se concluye

que la presencia de ambos compuestos produce la inhibición de la enzima [48], se puede pensar que al aumentar el estado fisiológico de la fruta se sintetizan estos nuevos compuestos, lo cual se observó en las diferencias significativas encontradas en características físico químicas como el peso y los grados Brix, produciéndose una diferencia en su composición; logrando concluir además, que no solo se produce la síntesis de los inhibidores de la enzima, sino también de otros compuestos posiblemente amortiguadores (buffers) que no permiten el cambio significativo de acidez y pH a pesar de la presencia de ácido fítico y taninos.

3.4. Determinación y análisis del estadio con mejor actividad proteolítica

3.4.1. Relación Actividad específica vs. Madurez

Como se puede observar en la Figura 3.13, no existe un comportamiento directamente proporcional entre la concentración y la actividad enzimática en función de la madurez de la fruta, por lo que se debió concluir en base a

la actividad específica, la cual relaciona ambas variables, indicando la actividad enzimática por cada miligramo de enzima presente (TU/mg).

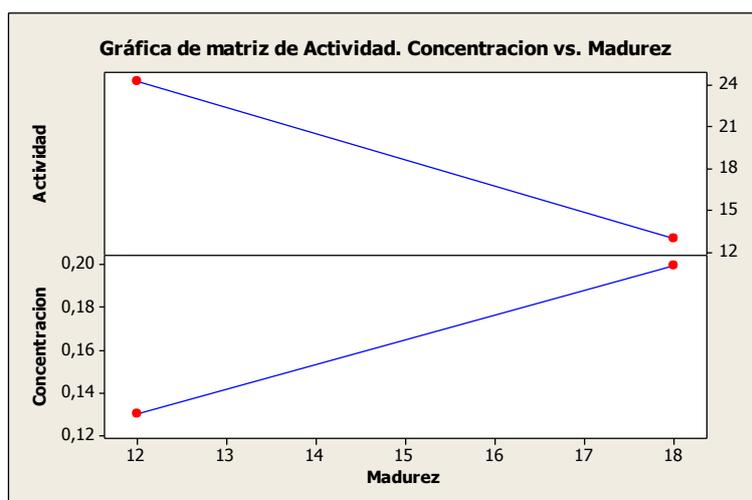


Figura 3.13. Gráfica de relación de Actividad y Concentración vs Madurez

Fuente: Minitab 15

En la Figura 3.14 se puede observar que el estadio con mayor actividad específica es el de 12 meses de maduración, presentando una actividad específica de 184.61 TU/mg en comparación con el valor de 64.99 TU/mg que presenta la de 18 meses, lo que significa que por cada miligramo de enzima obtenida de la piña de 12 meses tendremos el doble de actividad con respecto a la actividad

enzimática de la fruta de 18 meses; por este motivo se seleccionó la piña de 12 meses para continuar con el proceso de liofilización y determinar las pérdidas post tratamiento.

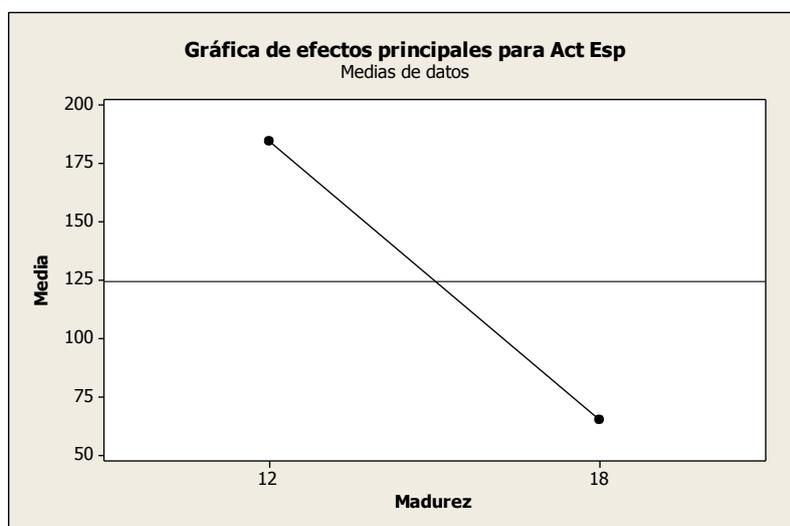


Figura 3.14. Gráfica de interacción entre Actividad Específica y Madurez
Fuente: Minitab 15

3.4.2. Análisis de la pérdida de actividad enzimática por el proceso de liofilización

Se comparó la actividad enzimática de la enzima purificada y la de la enzima purificada liofilizada para establecer la

pérdida de actividad luego del proceso de liofilización. La actividad enzimática del producto liofilizado fue 16.66 TU/ml, mientras que en promedio la actividad enzimática de la enzima purificada fue 24.23 TU/ml, es decir que la liofilización produjo una pérdida del 31.24% en la actividad enzimática de la bromelina, por lo tanto la liofilización permite mantener aproximadamente un 68.75% de la actividad enzimática de la bromelina.

En la Figura 3.15 se puede observar una gráfica comparativa de la actividad enzimática de los sistemas sometidos a estudio en el presente trabajo.

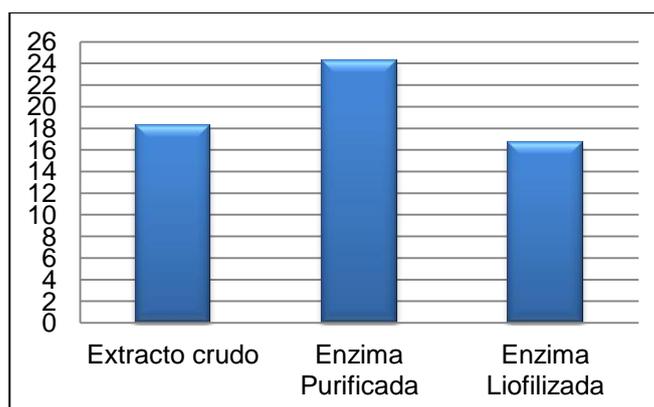


Figura 3.15. Gráfica de comparación de actividades enzimáticas

Elaborado por: Diana Coello & Juleen Hidalgo, 2013

De acuerdo al estudio realizado por Hernández y col (2004), el proceso de liofilización es el más recomendable para lograr la conservación del producto, ya que la enzima es capaz de mantener hasta en un 80% la actividad durante un año a -20°C , lo que resulta satisfactorio teniendo en cuenta que se han informado pérdidas mayores al 40% durante ese tiempo [49].

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Dentro de las características físico-químicas estudiadas para establecer la diferencia entre los meses de maduración de la piña, los grados Brix y el peso de la fruta fueron los indicadores más adecuados para diferenciar los estadios de madurez, concluyendo que el ratio no es, en el caso de la piña, un buen indicador de diferenciación de la madurez de la fruta.

Con un 95% de confianza se evidenció que existe diferencia significativa entre la concentración de la bromelina extraída de la pulpa de la piña de 12 y 18 meses de maduración, teniendo valores de 0.14 ± 0.038 y 0.2 ± 0.016 mg/ml de enzima correspondientemente, observándose mayor concentración en la piña más madura, debido a su desarrollo fisiológico en el que aumenta la síntesis de sustancias dentro de su composición, entre ella la enzima.

Existe suficiente evidencia estadística para concluir que la actividad enzimática de la bromelina de la piña de 12 meses es mayor a la actividad que presentó la de 18 meses, con los valores 24.23 ± 7.63 y 13.00 ± 3.18 TU/ml respectivamente, notándose así que al aumentar el estado fisiológico de la fruta disminuye la actividad enzimática, debido a que se sintetizan sustancias inhibidoras como el ácido fítico y tanino; logrando concluir además que durante el desarrollo fisiológico de la fruta no solo se produce la síntesis de los inhibidores de la enzima, sino también de otros compuestos posiblemente amortiguadores (buffers) que no permiten el cambio significativo de acidez y pH a pesar de la presencia del ácido fítico.

El sistema bifásico acuoso permitió la recuperación de la actividad enzimática en promedio de 30.21% y un índice de purificación de 2.16, con lo que podemos concluir que efectivamente existió una purificación enzimática, por lo cual se trabajó con los valores de actividad y concentración enzimática del extracto purificado para la determinación de las diferencias entre los grupos.

Se determinó que el mejor estadio de madurez para la extracción y purificación de la enzima es el de 12 meses, debido a que presenta una actividad específica de 184.61 TU/mg, superior a la de 18 meses de 64.99

TU/mg, tomándose en cuenta este valor debido a que representa el índice de pureza de la enzima, al relacionar la actividad y la concentración enzimática. Finalmente se puede concluir que la madurez de la piña perolera ejerce un efecto sobre la concentración y la actividad enzimática encontrándose que, al aumentar la madurez aumenta la concentración y sin embargo disminuye la actividad de la bromelina de la pulpa.

El porcentaje de pérdida de la actividad de la enzima liofilizada es de 31.24% notándose que se mantiene en más del 65% la actividad, determinando que la liofilización es un método de conservación poco severo para esta enzima.

Se recomienda un estudio de distintos métodos de extracción para determinar el método de mayor índice de recuperación enzimática, además de un estudio del método de purificación enzimático con diferentes pesos moleculares del polietilenglicol.

Se recomienda estudiar la composición de la piña en diferentes periodos de tiempo para determinar los posibles inhibidores de la actividad enzimática de la bromelina, generados durante el desarrollo fisiológico de la fruta.

Se recomienda un estudio comparativo entre posibles métodos de conservación de la enzima, para determinar si se puede conservar un porcentaje mayor de la actividad enzimática.

APÉNDICE A

DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA EN EXPERIMENTOS CON UN SOLO FACTOR

Para poder realizar el tanteo de Montgomery es necesario dejar el valor de Θ^2 en función de n , para lo cual es necesario calcular los demás valores de la Ec. 1, los cuales se muestran en la siguiente tabla.

Muestra	Concentración	Error	Cuadrado del Error
1	0,15	-0,13	0,016
2	0,18	-0,10	0,010
3	0,34	0,06	0,004
4	0,39	0,11	0,011
5	0,34	0,06	0,004
Promedio			0,28
Suma cuadrática (τ_i^2)			0,05
Varianza del error			0,011

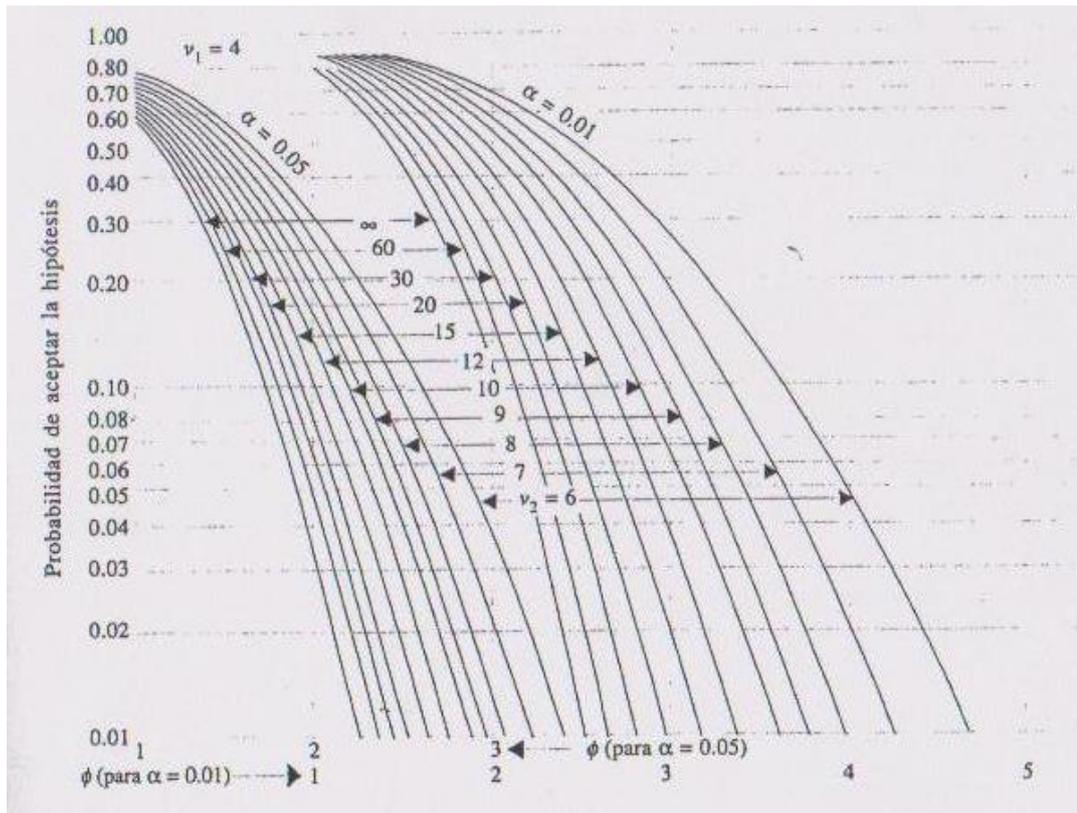
Una vez definido el valor de alfa ($\alpha= 0.05$), y los grados de libertad del numerador $\nu_1= a-1$ ingresamos a la Carta VII (Apéndice B) correspondiente al valor de $\nu_1=4$, para poder determinar los posibles valores de β de acuerdo al n planteado.

n	θ^2	θ	$v_2=a(n-1)$	β	$1-\beta$
3	2.73	1.65	10	0.35	0.65
4	3.64	1.91	15	0.15	0.85
5	4.54	2.13	20	0.08	0.92

De acuerdo al tanteo realizado se puede observar que el número de muestra adecuado para la experimentación es 4 para obtener un Beta igual a 0.15, ya que con $n=3$ el Beta es mayor a 0.2 y con $n=5$ el Beta tiene mayor seguridad, pero por facilidades de muestreo se establece el $n=4$.

APÉNDICE B

CARTA VII. CURVA DE OPERACIÓN CARACTERÍSTICA PARA EL ANÁLISIS DE VARIANZA DEL MODELO CON EFECTOS FIJOS



APÉNDICE C

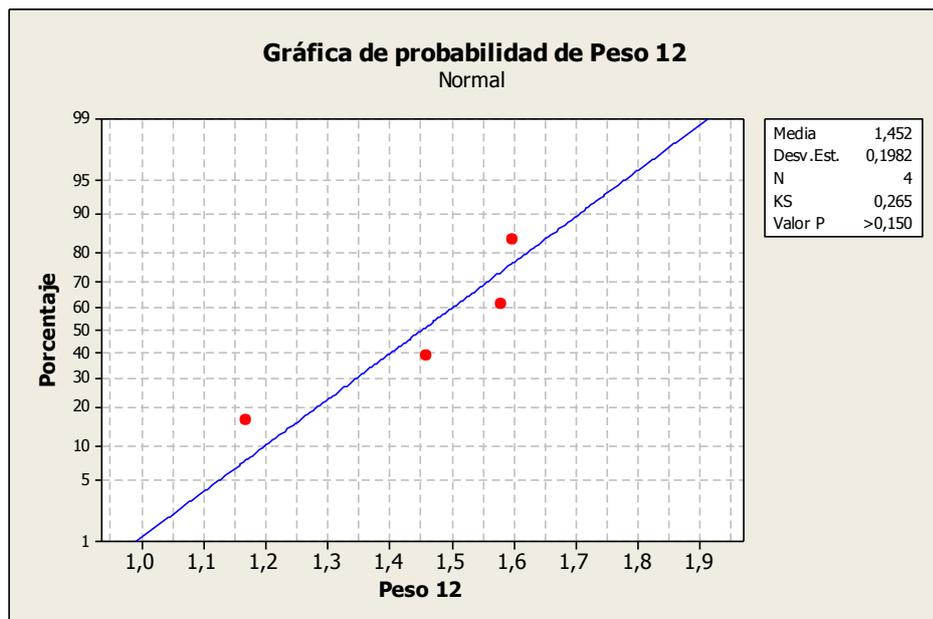
COMPROBACIÓN DE LOS SUPUESTOS DE LOS DATOS DE PESO

Comprobación de la normalidad de los datos

H_0 : Los datos del peso de la piña de 12 meses presentan una distribución normal

vs.

$H_1: \neg H_0$

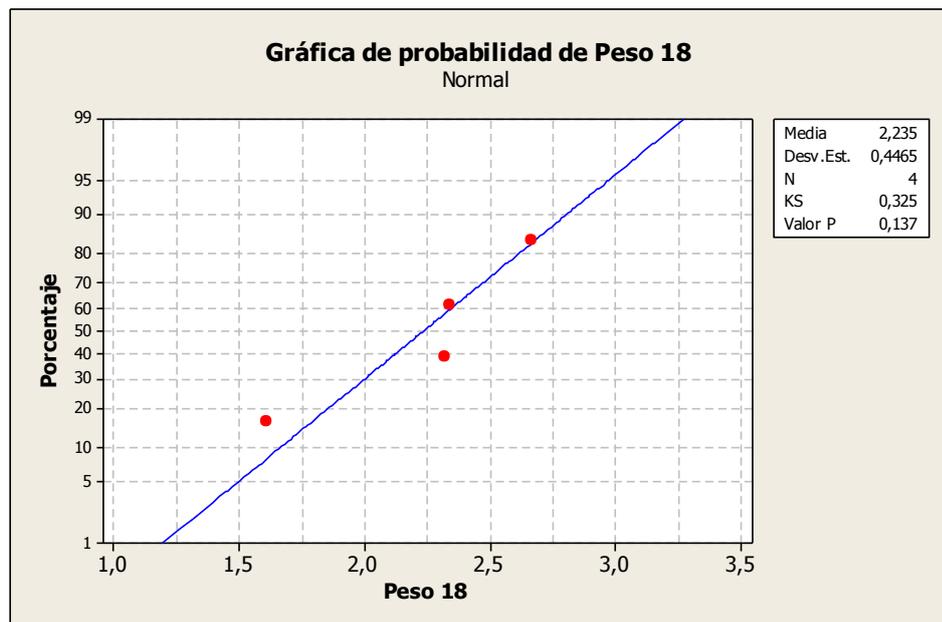


Con un valor P mayor a 0.1 (valor $P \Rightarrow 0.150$) existe suficiente evidencia estadística para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo que se concluye que los datos del peso de la piña de 12 meses presenta una distribución normal, con un nivel de confianza del 95%.

H_0 : Los datos del peso de la piña de 18 meses presentan una distribución normal

vs.

$H_1: \neg H_0$



Con un valor P mayor a 0.1 (valor $P=0.137$) existe suficiente evidencia estadística para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo que se concluye que los datos del peso de la piña de 18 meses presenta una distribución normal, con un nivel de confianza del 95%.

Comprobación del supuesto de varianzas poblacionales iguales

H_0 : Las σ^2 del peso de la piña de 12 meses y la piña de 18 meses son iguales

vs.

H_1 : $\neg H_0$

Prueba de varianzas iguales: Peso vs. Madurez				
Intervalos de confianza de Bonferroni de 95% para desviaciones estándares				
Madurez	N	Inferior	Desv.Est.	Superior
12	4	0,104177	0,198221	0,93877
18	4	0,234664	0,446505	2,11464
Prueba F (distribución normal)				
Estadística de prueba = 0,20. valor p = 0,215				

Con un valor P mayor a 0.1 (valor $P=0.215$) existe suficiente evidencia estadística para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo que se concluye que las varianzas de los pesos de las piñas son iguales.

APÉNDICE D

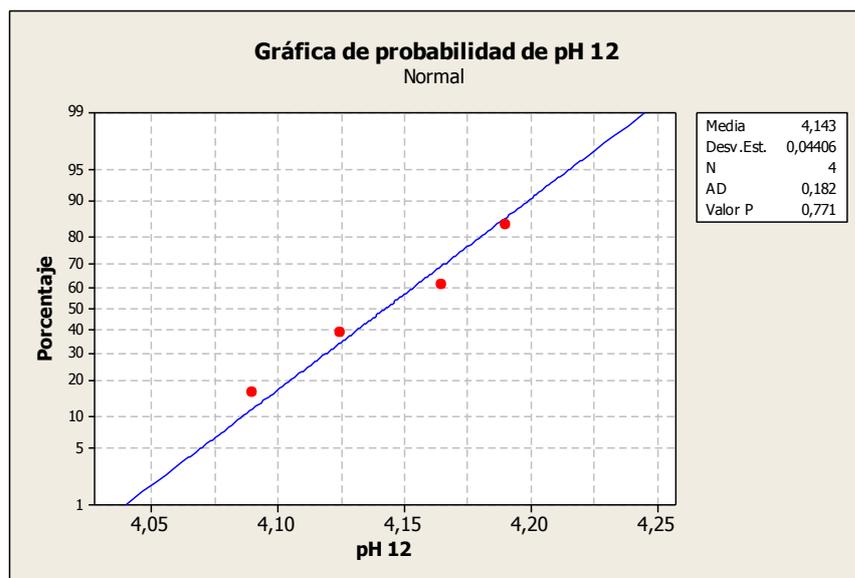
COMPROBACIÓN DE LOS SUPUESTOS DE LOS DATOS DE pH

Comprobación de la normalidad de los datos

H_0 : Los datos del pH de la piña de 12 meses presentan una distribución normal

vs.

$H_1: \neg H_0$

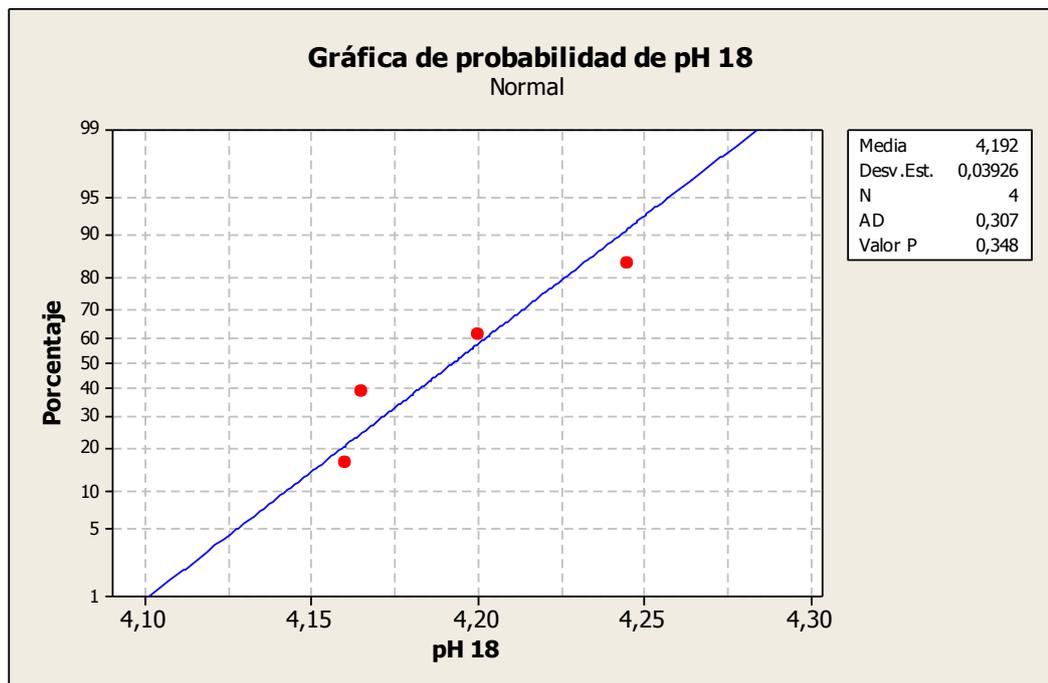


Con un valor P mayor a 0.1 (valor $P=0.771$) existe suficiente evidencia estadística para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo que se concluye que los datos del pH de la piña de 12 meses presenta una distribución normal, con un nivel de confianza del 95%.

H_0 : Los datos del pH de la piña de 18 meses presentan una distribución normal

vs.

$H_1: \neg H_0$



Con un valor P mayor a 0.1 (valor $P=0.348$) existe suficiente evidencia estadística para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo que se concluye que los datos del pH de la piña de 18 meses presenta una distribución normal, con un nivel de confianza del 95%.

Comprobación del supuesto de varianzas poblacionales iguales

H_0 : Las σ^2 del pH de la piña de 12 meses y la piña de 18 meses son iguales

vs.

H_1 : $\neg H_0$

Prueba de varianzas iguales: pH vs. Madurez				
Intervalos de confianza de Bonferroni de 95% para desviaciones estándares				
Madurez	N	Inferior	Desv.Est.	Superior
12	4	0,0231583	0,0440643	0,208688
18	4	0,0206355	0,0392641	0,185954
Prueba F (distribución normal)				
Estadística de prueba = 1,26. valor p = 0,854				

Con un valor P mayor a 0.1 (valor $P=0.854$) existe suficiente evidencia estadística para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo que se concluye que las varianzas de los pH de las piñas son iguales.

APÉNDICE E

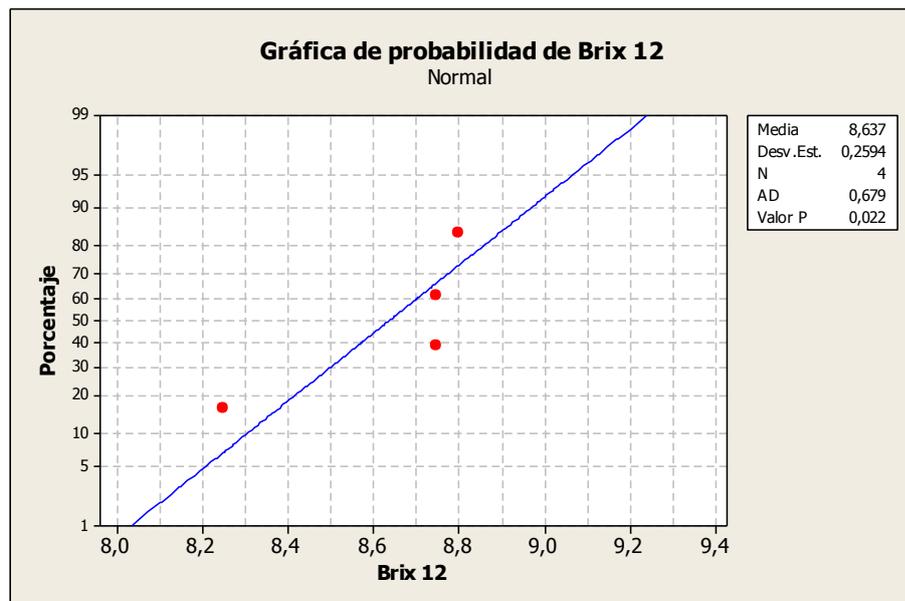
COMPROBACIÓN DE LOS SUPUESTOS DE LOS DATOS DE °BRIX

Comprobación de la normalidad de los datos

H_0 : Los datos de °Brix de la piña de 12 meses presentan una distribución normal

vs.

$H_1: \neg H_0$

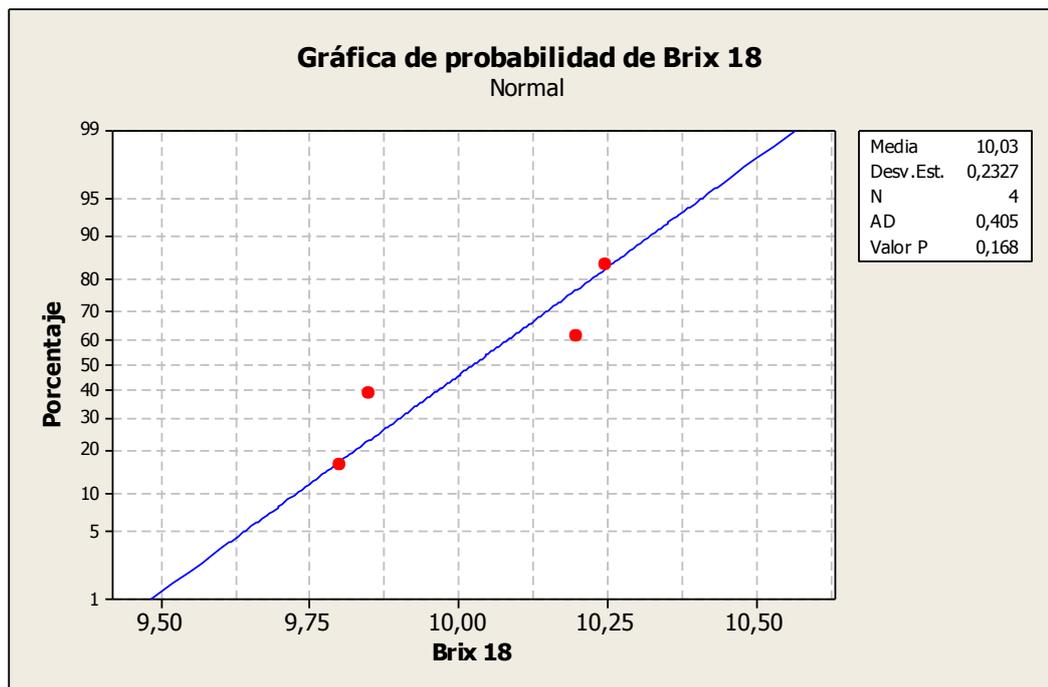


Con un valor P menor a 0.05 (valor $P=0.022$) existe suficiente evidencia estadística para rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo que se concluye que los datos de los grados Brix de la piña de 12 meses no presenta una distribución normal, con un nivel de confianza del 95%.

H_0 : Los datos de °Brix de la piña de 18 meses presentan una distribución normal

vs.

H_1 : $\neg H_0$



Con un valor P mayor a 0.1 (valor $P=0.168$) existe suficiente evidencia estadística para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo que se concluye que los datos de los grados Brix de la piña de 18 meses presenta una distribución normal, con un nivel de confianza del 95%.

Comprobación del supuesto de varianzas poblacionales iguales

H_0 : Las σ^2 de °Brix de la piña de 12 meses y la piña de 18 meses son iguales

vs.

H_1 : $\neg H_0$

Prueba de varianzas iguales: °Brix vs. Madurez				
Intervalos de confianza de Bonferroni de 95% para desviaciones estándares				
Madurez	N	Inferior	Desv.Est.	Superior
12	4	0,136333	0,259406	1,22854
18	4	0,122317	0,232737	1,10224
Prueba F (distribución normal)				
Estadística de prueba = 1,24. valor p = 0,863				

Con un valor P mayor a 0.1 (valor P=0.863) existe suficiente evidencia estadística para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo que se concluye que las varianzas de los grados brix de las piñas son iguales.

APÉNDICE F

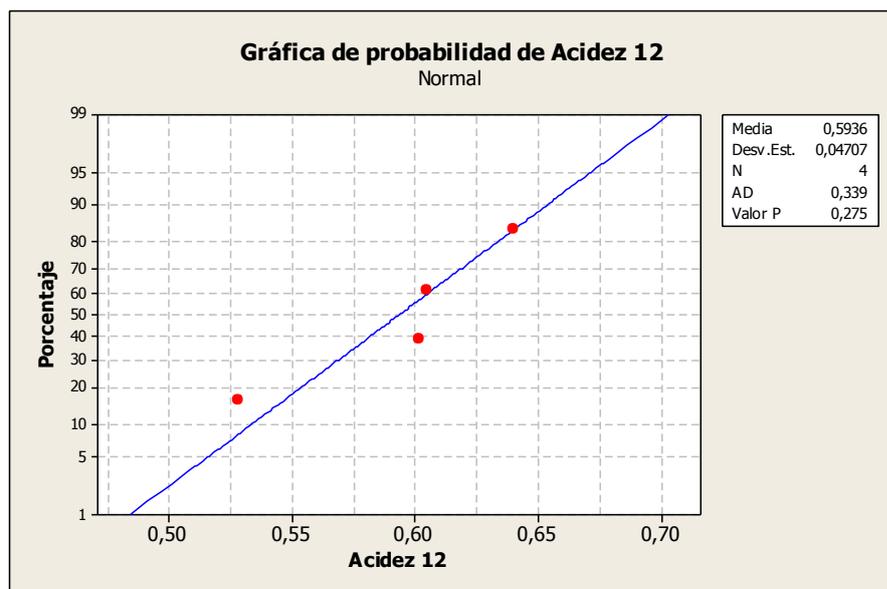
COMPROBACIÓN DE LOS SUPUESTOS DE LOS DATOS DE ACIDEZ

Comprobación de la normalidad de los datos

H_0 : Los datos de acidez de la piña de 12 meses presentan una distribución normal

vs.

H_1 : $\neg H_0$

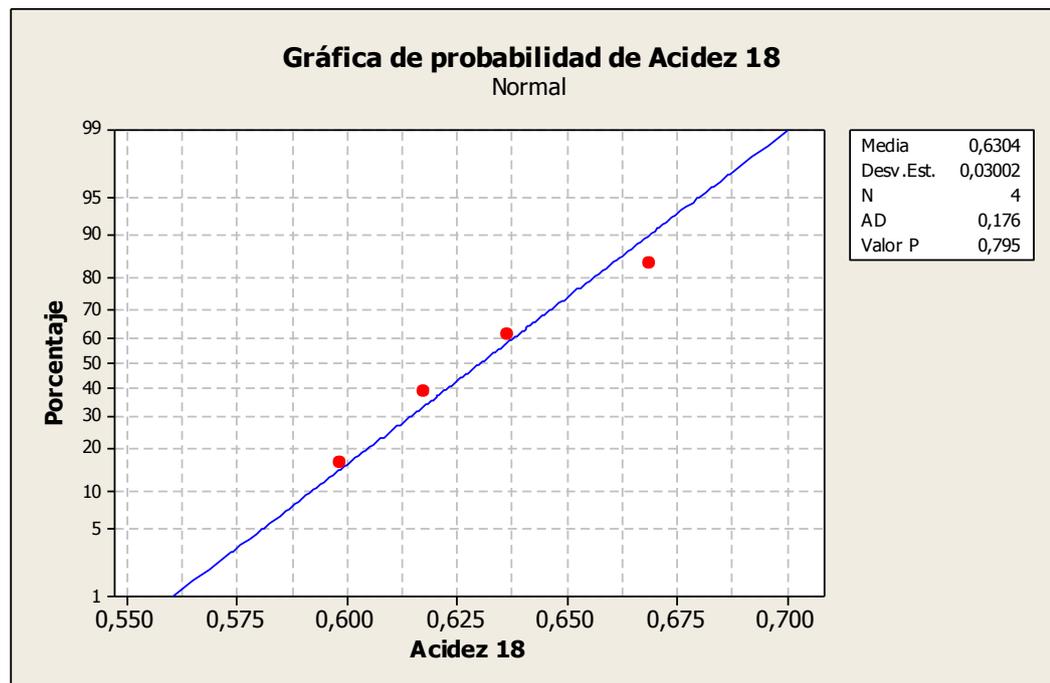


Con un valor P mayor a 0.1 (valor $P=0.275$) existe suficiente evidencia estadística para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo que se concluye que los datos de la acidez de la piña de 12 meses presenta una distribución normal, con un nivel de confianza del 95%.

H_0 : Los datos de acidez de la piña de 18 meses presentan una distribución normal

vs.

$H_1: \neg H_0$



Con un valor P mayor a 0.1 (valor $P=0.795$) existe suficiente evidencia estadística para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo que se concluye que los datos de la acidez de la piña de 18 meses presenta una distribución normal, con un nivel de confianza del 95%.

Comprobación del supuesto de varianzas poblacionales iguales

H_0 : Las σ^2 de la acidez de la piña de 12 meses y la piña de 18 meses son iguales

vs.

H_1 : $\neg H_0$

Prueba de varianzas iguales: Acidez vs. Madurez				
Intervalos de confianza de Bonferroni de 95% para desviaciones estándares				
Madurez	N	Inferior	Desv.Est.	Superior
12	4	0,0247361	0,0470665	0,222906
18	4	0,0157765	0,0300187	0,142168
Prueba F (distribución normal)				
Estadística de prueba = 2,46. valor p = 0,479				

Con un valor P mayor a 0.1 (valor $P=0.479$) existe suficiente evidencia estadística para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo que se concluye que las varianzas de las acidez de las piñas son iguales.

APÉNDICE G

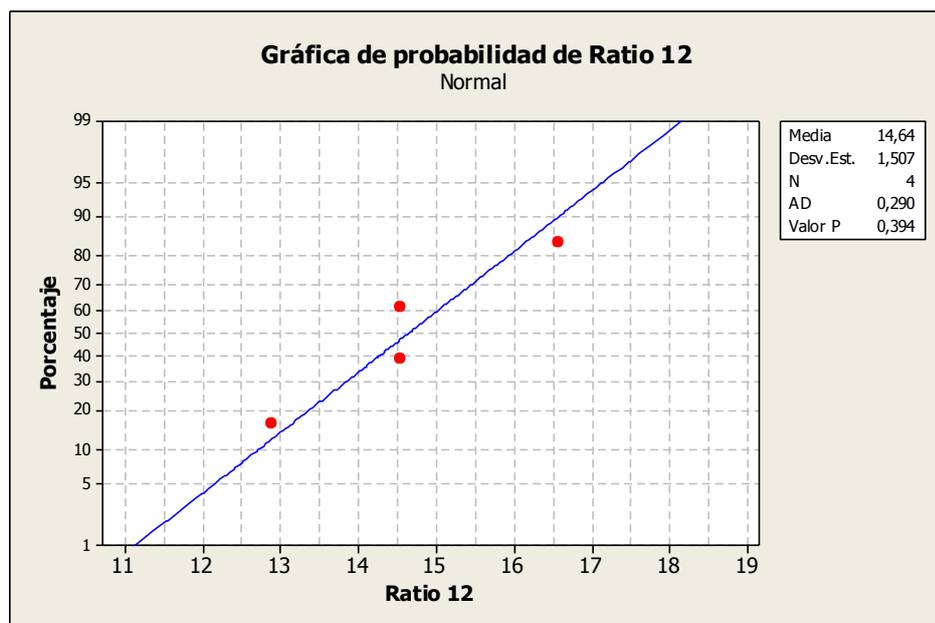
COMPROBACIÓN DE LOS SUPUESTOS DE LOS DATOS DE RATIO

Comprobación de la normalidad de los datos

H_0 : Los datos del ratio de la piña de 12 meses presentan una distribución normal

vs.

$H_1: \neg H_0$

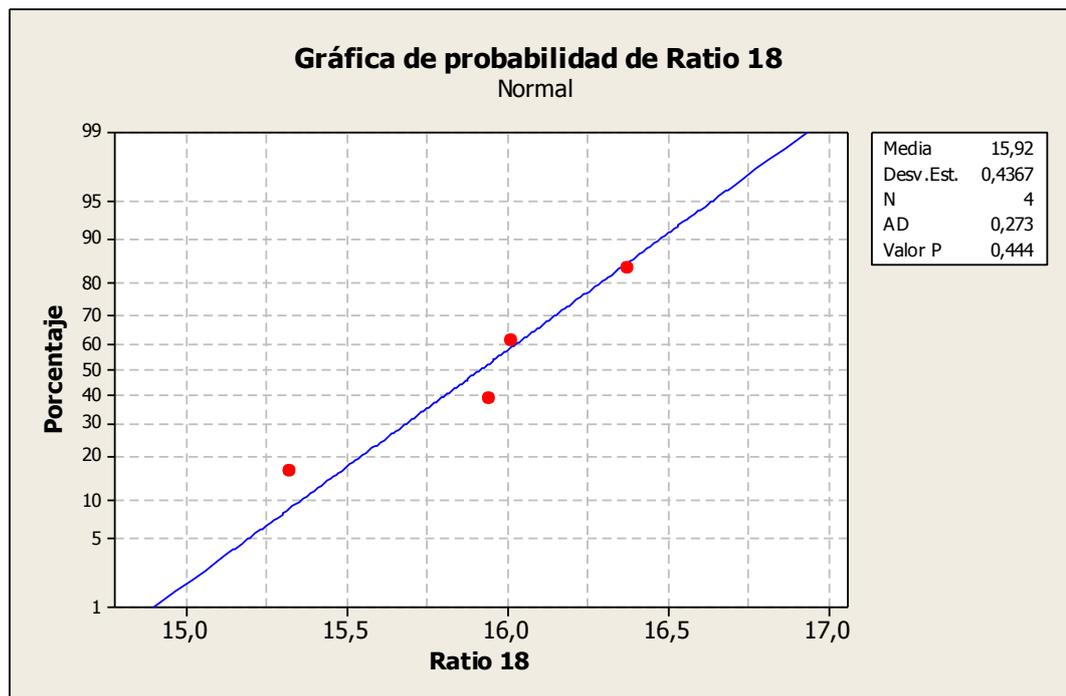


Con un valor P mayor a 0.1 (valor $P=0.394$) existe suficiente evidencia estadística para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo que se concluye que los datos del ratio de la piña de 12 meses presenta una distribución normal, con un nivel de confianza del 95%.

H_0 : Los datos del ratio de la piña de 18 meses presentan una distribución normal

vs.

$H_1: \neg H_0$



Con un valor P mayor a 0.1 (valor $P=0.444$) existe suficiente evidencia estadística para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo que se concluye que los datos del ratio de la piña de 18 meses presenta una distribución normal, con un nivel de confianza del 95%.

Comprobación del supuesto de varianzas poblacionales iguales

H_0 : Las σ^2 del ratio de la piña de 12 meses y la piña de 18 meses son iguales

vs.

H_1 : $\neg H_0$

Prueba de varianzas iguales: Ratio vs. Madurez				
Intervalos de confianza de Bonferroni de 95% para desviaciones estándares				
Madurez	N	Inferior	Desv.Est.	Superior
12	4	0,791830	1,50665	7,13547
18	4	0,229500	0,43668	2,06811
Prueba F (distribución normal)				
Estadística de prueba = 11,90. valor p = 0,072				

Con un valor P entre 0.05 y 0.1 (valor P=0.072) no existe suficiente evidencia estadística para rechazar o no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo que no se puede concluir con respecto a esta prueba y lo que se recomienda es realizar un nuevo muestreo y estudio para determinar si existe o no diferencia significativa.

APÉNDICE H

ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL MÉTODO DE BRADFORD

Supuestos del modelo: $e \sim N(0, \sigma^2)$

σ^2 es constante

$\text{Cov}(e_i, e_j) = 0 \quad i \neq j$

Análisis de regresión: Absorbancia vs. Concentración

La ecuación de regresión es

$$\text{Absorbancia} = -0,0527 + 2,72 \text{ Concentración}$$

Predictor	Coef	Coef. de EE	T	P
Constante	- 0,0527	0,02580	-2,04	0,134
Concentración	2,7167	0,1998	13,60	0,001
S = 0,0276251 R-cuad. = 98,4% R-cuad.(ajustado) = 97,9%				

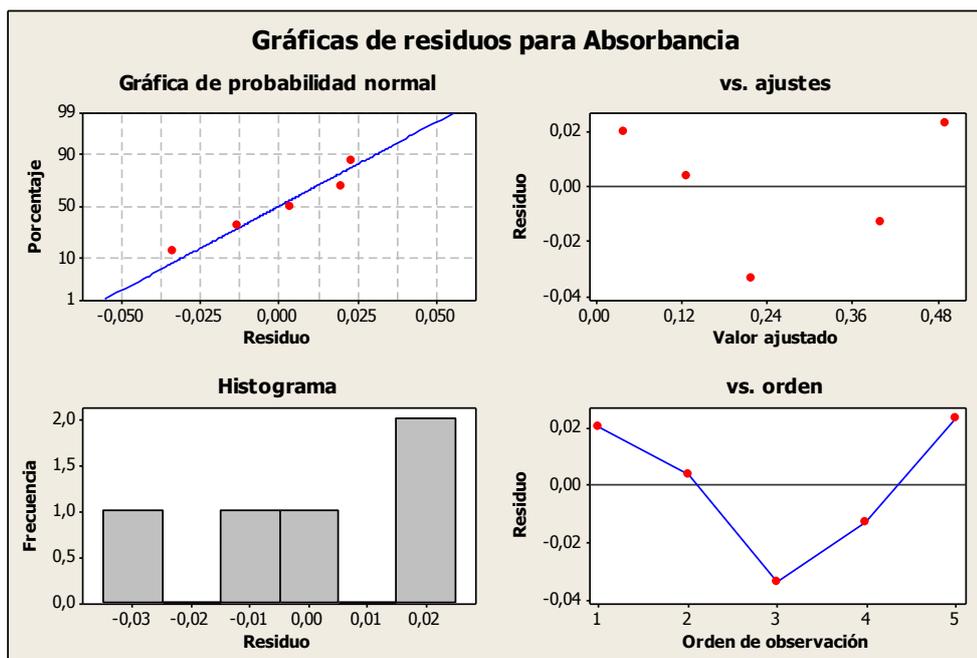
Análisis de varianza

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	1	0,14105	0,14105	184,83	0,001
Error residual	3	0,00229	0,00076		
Total	4	0,14334			

El valor P obtenido del Análisis de varianza (valor $P=0,001$), indica que la relación entre la concentración y la absorbancia es estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95%

Además, el valor de R^2 del modelo de regresión muestra que la concentración explica el 98,4% de la variabilidad de la absorbancia, lo que significa que el modelo se ajusta muy bien a los datos.

Comprobación de los supuestos del modelo



Mediante la Gráfica de residuos se pudo comprobar que se cumplen los supuestos del modelo, tanto la normalidad del error y su media de cero, así como la falta de correlación de los datos al no haber una predominancia de residuos positivos o negativos.

APÉNDICE I

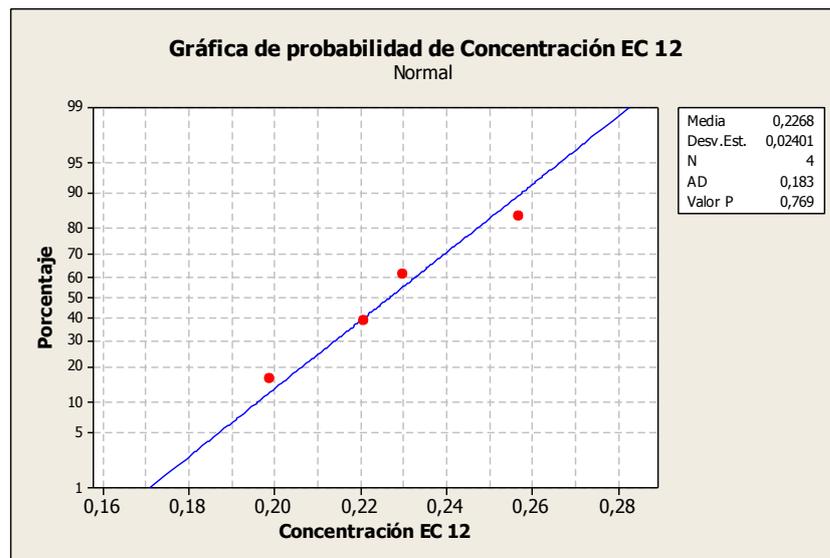
COMPROBACIÓN DE LA NORMALIDAD DE LOS DATOS DE CONCENTRACIÓN PROTEICA

Extracto crudo – 12 meses

H_0 : Los datos de concentración de enzima cruda de 12 meses presentan una distribución normal

vs.

H_1 : $\neg H_0$



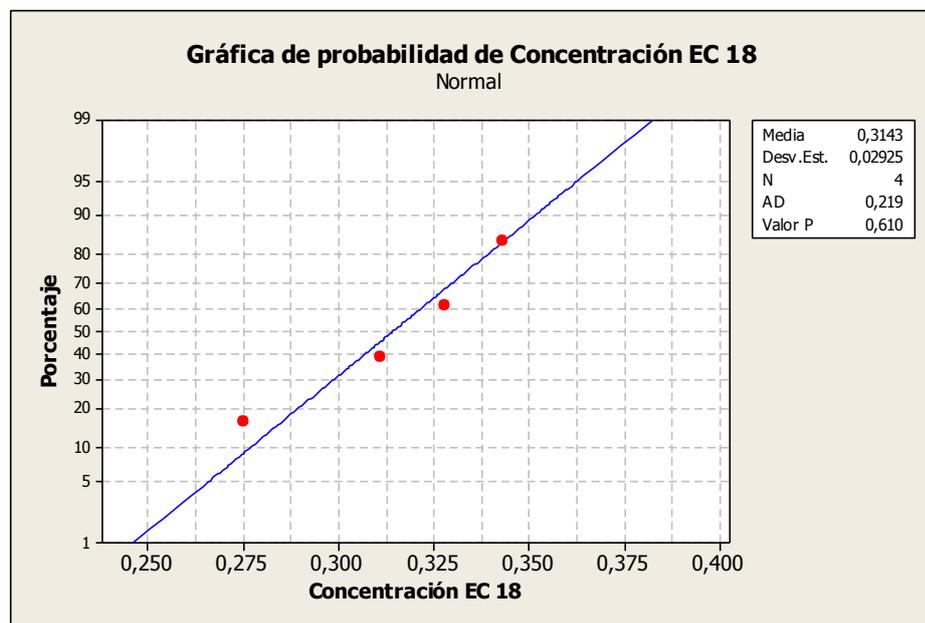
Con un valor P mayor a 0.1 (valor P=0.769) existe suficiente evidencia estadística para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo que se concluye que los datos de la concentración proteica del extracto crudo de la piña de 12 meses presenta una distribución normal, con un nivel de confianza del 95%.

Extracto crudo – 18 meses

H_0 : Los datos de concentración de enzima cruda de 18 meses presentan una distribución normal

vs.

$H_1: \neg H_0$



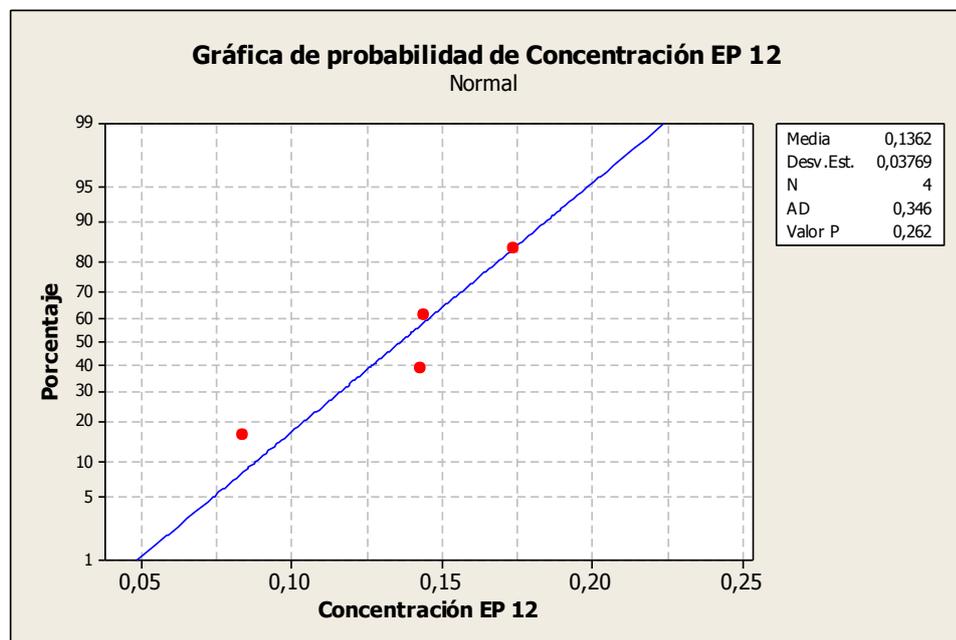
Con un valor P mayor a 0.1 (valor $P=0.61$) existe suficiente evidencia estadística para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo que se concluye que los datos de la concentración proteica del extracto crudo de la piña de 18 meses presenta una distribución normal, con un nivel de confianza del 95%.

Enzima purificada – 12 meses

H_0 : Los datos de concentración de enzima purificada de 12 meses presentan una distribución normal

vs.

$H_1: \neg H_0$



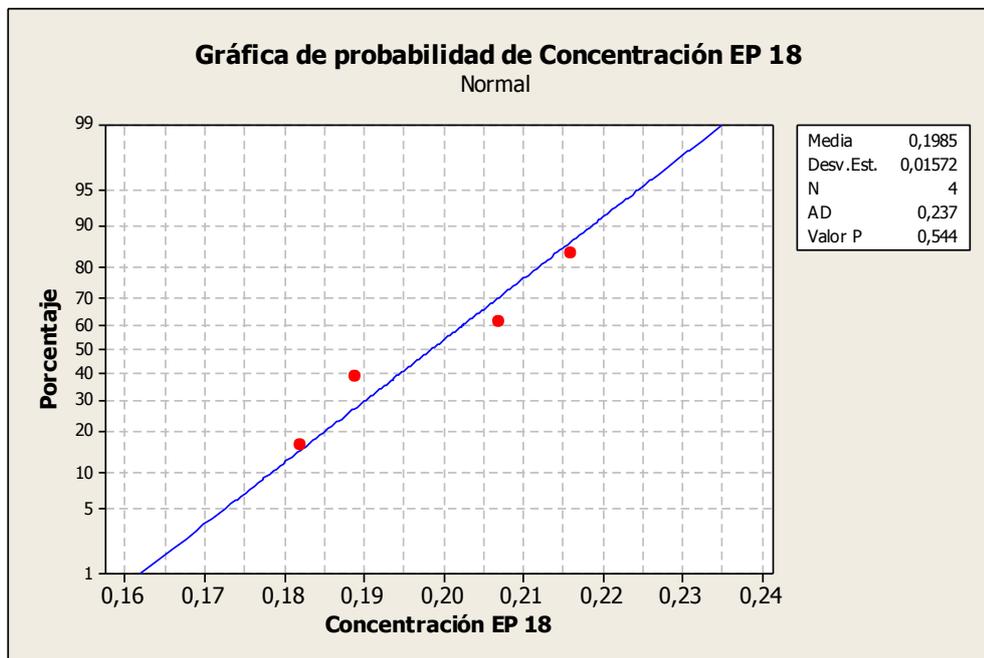
Con un valor P mayor a 0.1 (valor $P=0.262$) existe suficiente evidencia estadística para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo que se concluye que los datos de la concentración proteica del extracto purificado de la piña de 12 meses presenta una distribución normal, con un nivel de confianza del 95%.

Enzima purificada – 18 meses

H_0 : Los datos de concentración de enzima purificada de 18 meses presentan una distribución normal

vs.

$H_1: \neg H_0$



Con un valor P mayor a 0.1 (valor $P=0.544$) existe suficiente evidencia estadística para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo que se concluye que los datos de la concentración proteica del extracto purificado de la piña de 18 meses presenta una distribución normal, con un nivel de confianza del 95%.

APÉNDICE J

COMPROBACIÓN DEL SUPUESTO DE VARIANZAS POBLACIONALES IGUALES PARA LOS DATOS DE CONCENTRACIÓN PROTEICA

Extracto crudo

H_0 : Las σ^2 de las concentraciones proteicas del extracto crudo de la piña de 12 meses y las de 18 meses son iguales

vs.

H_1 : $\neg H_0$

Prueba de varianzas iguales: Concentraciones EC vs. Madurez				
Intervalos de confianza de Bonferroni de 95% para desviaciones estándares				
Madurez	N	Inferior	Desv.Est.	Superior
12	4	0,0126161	0,0240052	0,113688
18	4	0,0153727	0,0292504	0,138529
Prueba F (distribución normal)				
Estadística de prueba = 0,67. valor p = 0,753				

Con un valor P mayor a 0.1 (valor P=0.753) existe suficiente evidencia estadística para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo que se concluye que las varianzas de las concentraciones proteicas del extracto crudo de la piña de 12 meses y las de 18 meses son iguales, con un nivel de confianza del 95%.

Enzima purificada

H_0 : Las σ^2 de las concentraciones proteicas de la enzima purificada de la piña de 12 meses y las de 18 meses son iguales

vs.

H_1 : $\neg H_0$

Prueba de varianzas iguales: Concentraciones EP vs. Madurez				
Intervalos de confianza de Bonferroni de 95% para desviaciones estándares				
Madurez	N	Inferior	Desv.Est.	Superior
12	4	0,0198062	0,0376862	0,178481
18	4	0,0082598	0,0157162	0,074432
Prueba F (distribución normal)				
Estadística de prueba = 5,75. valor p = 0,185				

Con un valor P mayor a 0.1 (valor $P=0.185$) existe suficiente evidencia estadística para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo que se concluye que las varianzas de las concentraciones proteicas de la enzima purificada de la piña de 12 meses y las de 18 meses son iguales, con un nivel de confianza del 95%.

APÉNDICE K

ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL MÉTODO DE UNIDAD DE TIROSINA

Supuestos del modelo: $e \sim N(0, \sigma^2)$

σ^2 es constante

$\text{Cov}(e_i, e_j) = 0 \quad i \neq j$

Análisis de regresión: U Tirosina vs. Concentración

La ecuación de regresión es

U Tirosina = - 0,0270 + 0,00795 Concentración

Predictor	Coef	Coef. de EE	T	P
Constante	-0,027000	0,002174	-12,42	0,006
Concentración	0,00794800	0,00003175	250,34	0,000
S = 0,00177482 R-cuad. = 100,0% R-cuad.(ajustado) = 100,0%				

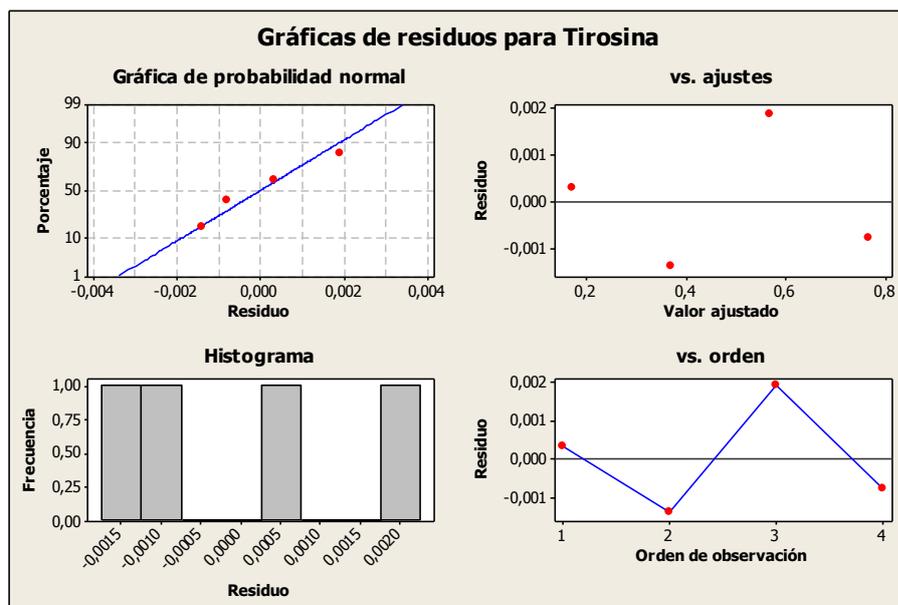
Análisis de varianza

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	1	0,19741	0,19741	62669,35	0,000
Error residual	2	0,00001	0,00000		
Total	3	0,19741			

El valor P obtenido del Análisis de varianza (valor $P=0$), indica que la relación entre la concentración de tirosina y absorbancia es estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95%.

Además, el valor de R^2 del modelo de regresión muestra que la concentración explica el 100% de la variabilidad de la absorbancia, lo que significa que el modelo se ajusta muy bien a los datos.

Comprobación de los supuestos del modelo



Mediante la Gráfica de residuos se pudo comprobar que se cumplen los supuestos del modelo, tanto la normalidad del error y su media de cero, así como la falta de correlación de los datos y la aleatoriedad del error.

APÉNDICE L

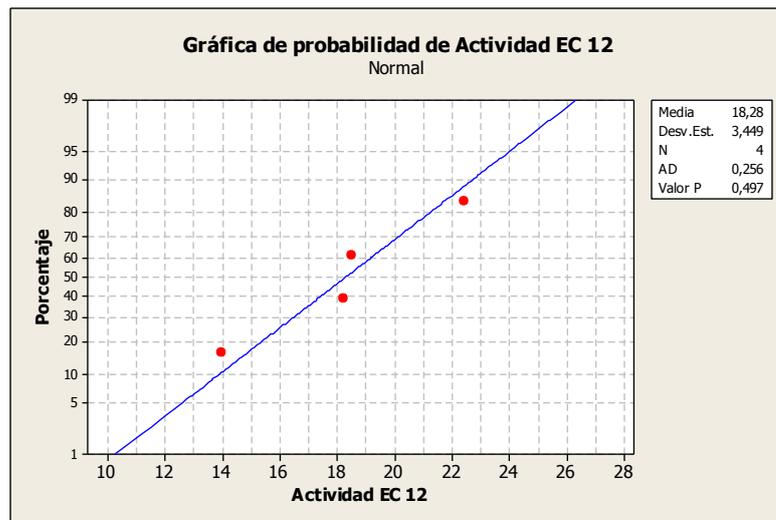
COMPROBACIÓN DE LA NORMALIDAD DE LOS DATOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Extracto crudo – 12 meses

H_0 : Los datos de la actividad enzimática del extracto crudo de la piña de 12 meses presentan una distribución normal

vs.

H_1 : $\neg H_0$



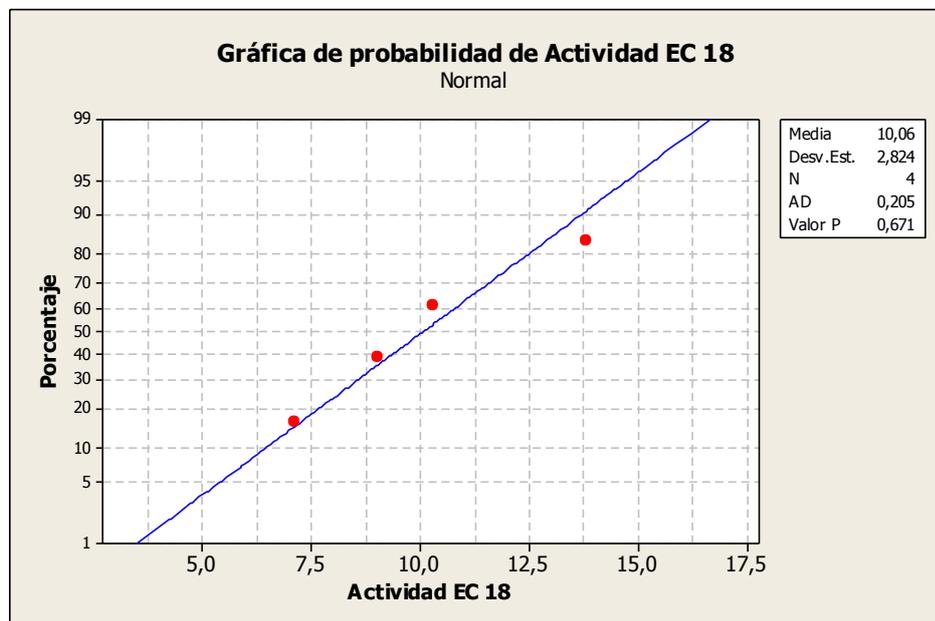
Con un valor P mayor a 0.1 (valor $P=0.497$) existe suficiente evidencia estadística para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo que se concluye que los datos de la actividad enzimática del extracto crudo de la piña de 12 meses presenta una distribución normal, con un nivel de confianza del 95%.

Extracto crudo – 18 meses

H_0 : Los datos de la actividad enzimática del extracto crudo de la piña de 18 meses presentan una distribución normal

vs.

$H_1: \neg H_0$



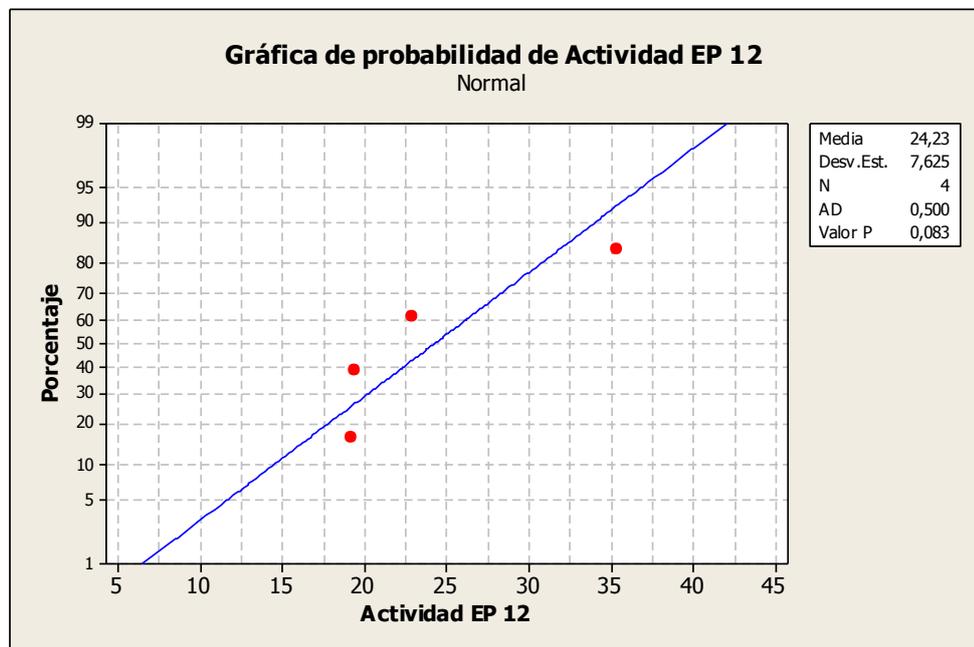
Con un valor P mayor a 0.1 (valor $P=0.671$) existe suficiente evidencia estadística para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo que se concluye que los datos de la actividad enzimática del extracto crudo de la piña de 18 meses presenta una distribución normal, con un nivel de confianza del 95%.

Enzima purificada – 12 meses

H_0 : Los datos de la actividad enzimática de la enzima purificada extraída de la piña de 12 meses presentan una distribución normal

vs.

$H_1: \neg H_0$



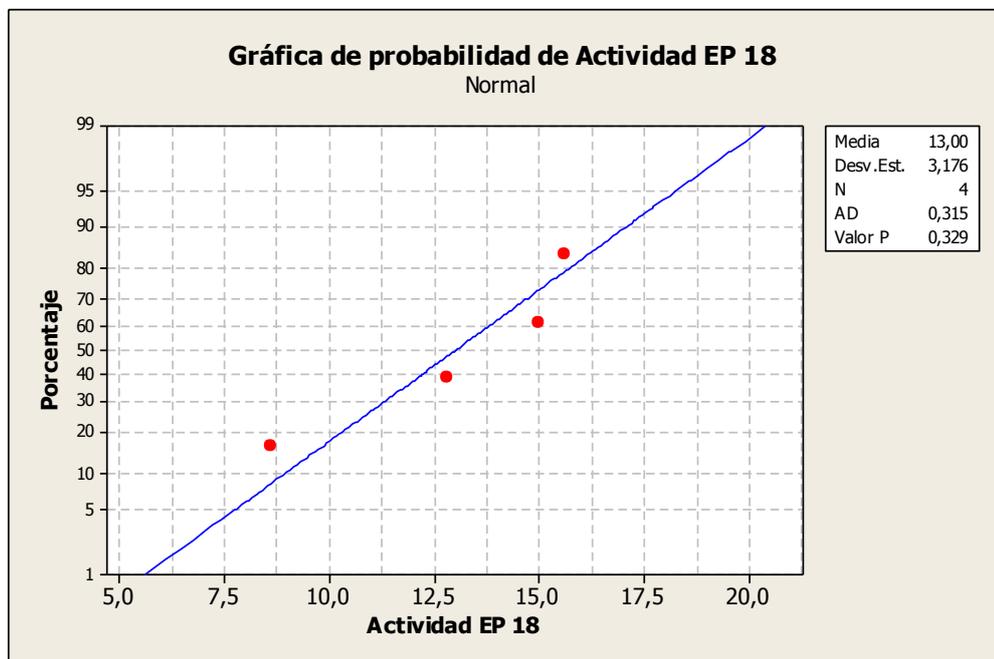
Con un valor P mayor a 0.05 (valor $P=0.083$) existe suficiente evidencia estadística para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo que se concluye que los datos de la actividad enzimática de la enzima purificada extraída de la piña de 12 meses presenta una distribución normal, con un nivel de confianza del 95%.

Enzima purificada – 18 meses

H_0 : Los datos de la actividad enzimática de la enzima purificada extraída de la piña de 18 meses presentan una distribución normal

vs.

$H_1: \neg H_0$



Con un valor P mayor a 0.1 (valor $P=0.329$) existe suficiente evidencia estadística para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo que se concluye que los datos de la actividad enzimática de la enzima purificada extraída de la piña de 18 meses presenta una distribución normal, con un nivel de confianza del 95%.

APÉNDICE M

COMPROBACIÓN DEL SUPUESTO DE VARIANZAS POBLACIONALES IGUALES PARA LOS DATOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Extracto crudo

H_0 : Las σ^2 de los datos de las actividades enzimáticas del extracto crudo de la piña de 12 meses y la de 18 meses son iguales

vs.

H_1 : $\neg H_0$

Prueba de varianzas iguales: Actividad EC vs. Madurez				
Intervalos de confianza de Bonferroni de 95% para desviaciones estándares				
Madurez	N	Inferior	Desv.Est.	Superior
12	4	1,81249	3,44871	16,3330
18	4	1,48404	2,82376	13,3733
Prueba F (distribución normal)				
Estadística de prueba = 1,49. valor p = 0,750				

Con un valor P mayor a 0.1 (valor P=0.750) existe suficiente evidencia estadística para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo que se concluye que las varianzas de las actividades enzimáticas del extracto crudo de la piña de 12 meses y las de 18 meses son iguales, con un nivel de confianza del 95%.

Enzima purificada

H_0 : Las σ^2 de los datos de las actividades enzimáticas de la enzima purificada extraída de la piña de 12 meses y la de 18 meses son iguales

vs.

H_1 : $\neg H_0$

Prueba de varianzas iguales: Actividades EP vs. Madurez				
Intervalos de confianza de Bonferroni de 95% para desviaciones estándares				
Madurez	N	Inferior	Desv.Est.	Superior
12	4	4,00715	7,62459	36,1099
18	4	1,66914	3,17594	15,0412
Prueba F (distribución normal)				
Estadística de prueba = 5,76. valor p = 0,184				

Con un valor P mayor a 0.1 (valor $P=0.184$) existe suficiente evidencia estadística para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo que se concluye que las varianzas de las actividades enzimáticas de la enzima purificada extraída de la piña de 12 meses y las de 18 meses son iguales, con un nivel de confianza del 95%.

APÉNDICE N



Enzyme Development Corporation

(212) 736-1580 21 Penn Plaza, New York, NY 10001

E-mail: info@EnzymeDevelopment.com

MÉTODO ANALÍTICO DE LA UNIDAD DE TIROSINA (TU)

COPIA NO CONTROLADA

A. Principio: Las enzimas proteolíticas hidrolizan un sustrato proteico formando varios productos de degradación tales como los aminoácidos. Usando caseína como sustrato uno de los aminoácidos formados tras la hidrólisis es la L-tirosina. La L-tirosina absorbe fuertemente a 280 nm y la concentración de la tirosina es una función de densidad óptica que sigue la Ley de Beer.

B. Equipo:

1. Potenciómetro
2. Baño de agua a temperatura constante a $40.0^{\circ} \pm 0.1^{\circ} \text{C}$
3. Balanza analítica
4. Espectrofotómetro a 280 nm
5. Matraces aforados
6. Pipetas aforadas
7. Embudo de pistilo largo
8. Tubos de 25 ml con tapa de rosca
9. Tubos de ensayo desechables
10. Cronómetro
11. Papel filtro Whatman #1
12. Micropipetas

C. Medidas de seguridad:

1. Siga las medidas de seguridad estándar del laboratorio.
2. Ácido tricloroacético: Use guantes para evitar quemaduras.

D. Reactivos y preparación de reactivos: El sustrato, búfer y reactivo de terminación deben ser preparados diariamente. (Los volúmenes pueden ajustarse según sea necesario).

1. Sustrato de caseína:

- a. Coloque un vaso de precipitado de 2000 a 4000 ml en una placa caliente que tenga agitación.
- b. Añada agua y ponga a hervir.

Estas sugerencias y datos están basados en información que consideramos confiable. Son ofrecidas de buena fe, pero sin garantía debido a que las condiciones y métodos de uso de nuestros productos están más allá de nuestro control. Las sugerencias de uso de nuestros productos no deben ser entendidas como recomendaciones que incurran en la violación de cualquier patente o regulación gubernamental.

- c. En un matraz aforado de 250 ml disuelva y diluya 1.775 g de fosfato disódico anhídrido en agua destilada.
- d. En un vaso de precipitado de 400 ml. Agregue 2.5 g de caseína Calbiochem (o el peso seco que se haya encontrado usando el procedimiento para pérdidas por secado de acuerdo con las determinaciones de humedad para cada lote de reactivo) en 125 ml de la solución de fosfato disódico previamente preparada. Use una barra agitadora y un mezclador
- e. Cubra la solución con papel aluminio.
- f. Coloque el sustrato de caseína en un baño de agua hirviendo y agítelo de manera constante por 30 minutos. Asegúrese que el agua no alcance el borde del vaso. Coloque el vaso con la caseína junto con otro vaso lleno de agua para minimizar el movimiento causado por la ebullición.
- g. Quite el vaso de precipitado del agua hirviendo y enfríe a temperatura ambiente en un baño de agua fría con agitación constante.
- h. En un matraz aforado disuelva 1.05 g de ácido cítrico monohidratado en agua destilada y diluya a 100 ml.
- i. Ajuste el pH de la solución de caseína (el pH original debe ser cerca de 7.2) a 6.0 con la solución de ácido cítrico, agregándolo lentamente para evitar la destrucción de las proteínas (use aproximadamente 35 ml de ácido).
- j. Transfiera la caseína a un matraz aforado de 250 ml y diluya en agua destilada.

2. Solución búfer de Cisteína-Versene – Dependiendo del número de muestras y las diluciones necesarias se requerirán de entre 2 a 4 L de este búfer. Para preparar 2 litros:

- a. Coloque en un agitador magnético un vaso de precipitado de 2000 ml o más.
- b. Añada aproximadamente 1600 -1700 ml de agua destilada.
- c. Agregue cuantitativamente:
 - 14.20 g de fosfato de sodio dibásico anhídrido
 - 12.20 g de L-cisteína
 - 28.00 g de EDTA
- d. Agite todos los ingredientes hasta disolverlos.
- e. Ajuste el pH del búfer (el pH original es de 5.7) a 6.0 con NaOH 1N (utilizará aproximadamente 20 ml).
- f. Transfiera el búfer a un matraz aforado de 2000 ml y diluya en agua destilada.
- g. Repita el procedimiento anterior si necesita más búfer.

3. Solución de terminación (TCA): Ácido tricloroacético (30%) – Se requieren 18 ml para cada muestra.

- a. Disuelva 30 g de ácido tricloroacético en agua destilada y transfiera a un matraz aforado de 100 ml. Diluya en más agua.

E. Procedimiento

1. Preparación de la enzima:

- a. Disuelva una cantidad apropiada de la enzima en la solución búfer de Cisteína-Versene. Use el mismo búfer si requiere diluciones seriadas. La enzima diluida

Estas sugerencias y datos están basados en información que consideramos confiable. Son ofrecidas de buena fe, pero sin garantía debido a que las condiciones y métodos de uso de nuestros productos están más allá de nuestro control. Las sugerencias de uso de nuestros productos no deben ser entendidas como recomendaciones que incurran en la violación de cualquier patente o regulación gubernamental.

debe ser usada en un lapso de 30 minutos. La concentración de la dilución final deberá corresponder a una absorbancia de aproximadamente 0.2600 y a una concentración de entre 2.5 y 6.5 TU/ml.

b. Cálculo para la preparación de la enzima:

$$\text{peso de la muestra en gramos} = \frac{0.2600 \times (\text{curva de tirosina})}{\text{TU/g (Objetivo)}}$$

2. Evaluación de la enzima: Cada juego de pruebas consiste de 2 pruebas de enzimas y un blanco. Proceda de la siguiente forma:
 - a. Transfiera 10.0 ml del sustrato de caseína en 3 tubos de 25 ml etiquetados, dos para cada enzima y uno para el blanco.
 - b. Equilibre los tubos a 40° C por aproximadamente 10 minutos.
 - c. Al tiempo cero inicie el cronómetro y añada 4.0 ml de la solución de la enzima al primer tubo. Cierre el tubo e invierta suavemente varias veces. Ponga el tubo en un baño de agua a 40° C. Continúe la adición de la enzima a cada tubo, excepto al blanco, a intervalos suficientes (se recomienda 1 minuto).
 - d. Después de exactamente 60 minutos añada rápidamente a cada tubo con la preparación de la enzima 6.0 ml de la solución TCA. Agite vigorosamente y regrese los tubos al baño de agua por 30 minutos a 40° C para completar la coagulación de la caseína precipitada.
 - e. Para preparar el blanco añada 6.0 ml de solución TCA al sustrato de caseína seguido por 4.0 ml de enzima. Agite vigorosamente y regrese el tubo al baño de agua por 30 minutos a 40° C para completar la coagulación de la caseína precipitada.
 - f. Al final de los 30 minutos remueva cada tubo del baño de agua y permita que se enfríen a temperatura ambiente.
 - g. Una vez fríos filtre a través de papel filtro Whatman #1 (los tubos pueden ser agitados antes de filtrarlos para despegar la proteína precipitada). Filtre de nuevo a través del mismo papel filtro.
 - h. Lea la absorbancia de los filtrados en una cuveta de 1 cm a 280 nm usando aire para iniciar el espectrofotómetro en cero. Corrija el valor de A_{280} de cada enzima sustrayendo la lectura del blanco de cada muestra.
3. La curva de tirosina (hecha aproximadamente cada 3 meses)
 - a. Disuelva 100 mg de L-tirosina en ácido clorhídrico 0.10 N (HCL) y diluya a 1 L en un matraz aforado.
 - b. Prepare las siguientes soluciones usando HCl 0.10N como diluyente:

Concentración Final	Dilución de la Solución Madre de Tirosina
25.0µg/ml	25ml/100ml
50.0µg/ml	50ml/100ml
75.0µg/ml	75ml/100ml

- c. Determine espectrofotométricamente a 280 nm en una cuveta de 1cm la absorbancia de las soluciones de tirosina a 25.0, 50.0, 75.0 y 100.0 µg de tirosina

Estas sugerencias y datos están basados en información que consideramos confiable. Son ofrecidas de buena fe, pero sin garantía debido a que las condiciones y métodos de uso de nuestros productos están más allá de nuestro control. Las sugerencias de uso de nuestros productos no deben ser entendidas como recomendaciones que incurran en la violación de cualquier patente o regulación gubernamental.

- por ml. Use HCl 0.1N para iniciar el instrumento en cero.
 d. Grafique la absorbancia contra la concentración de tirosina.
 e. Determine la pendiente en términos de absorbancia por μg de tirosina (la pendiente debe caer entre 0.0064 y 0.0076).

F. Cálculos:

- Definición de unidad: Una unidad de potencia puede ser definida como la unidad que al actuar sobre el sustrato de caseína bajo las condiciones específicas produce un microgramo de tirosina por minuto.
- El número de TU/g en una mezcla de digestión o contenida en la cantidad preparada de enzima se calcula como:

$$\text{O.D.} \times \text{D.F.} / 4 \times 20 / 60 \times 1 / \text{pendiente} = \text{TU/g}$$

- O.D. = Densidad óptica de la prueba menos la densidad óptica del blanco
 D.F. = Factor de dilución de la solución de enzima (1/concentración final de la enzima)
 4 = Volumen de la solución de enzima inyectada
 20 = Volumen total del sustrato, enzima y reactivo de terminación (TCA)
 60 = Duración de la hidrólisis en minutos
 Pendiente = Pendiente obtenida de la curva de tirosina (ver la curva de tirosina).

Para facilitar el cálculo, un factor (cálculo en negrillas en la fórmula anterior) puede ser calculado incorporando volúmenes constantes y la pendiente puede ser obtenida de la curva de tirosina (ver la curva de tirosina).

- El número de TU por gramo de una preparación de enzima es la actividad TU de la preparación.

Por lo tanto: Actividad TU = $\frac{\text{A}_{280} \text{ del filtrado} \times \text{factor de la curva de tirosina}}{\text{Concentración de la enzima (g/ml)}}$

Ejemplo: O.D. = 0.2600
 Factor = 13.0
 Concentración final = 0.00003600 (1/Factor de dilución)
 $\text{TU} = 0.2600 \times 13.0 / 0.00003600 = 94,000 \text{ TU/G}$

G. Exactitud de los parámetros de prueba:

- Rango: Las lecturas de absorbancia después de la corrección con el blanco deben ser de entre 0.150 y 0.700 y pueden usarse para encontrar la actividad aproximada de muestras desconocidas. Sin embargo, la prueba final debe caer dentro del rango de 0.200 a 0.500.
- Pruebas duplicadas a diferentes niveles de enzimas no deberán variar por más del 3%.

H. Referencia:

- A.S.B.C. PROCEEDINGS p. 225-228, Some Physical and Chemical Properties of Commercial Chillproofing Compounds, Harold E. Weissler and Adan C. Garza.

COPIA NO CONTROLADA

Estas sugerencias y datos están basados en información que consideramos confiable. Son ofrecidas de buena fe, pero sin garantía debido a que las condiciones y métodos de uso de nuestros productos están más allá de nuestro control. Las sugerencias de uso de nuestros productos no deben ser entendidas como recomendaciones que incurran en la violación de cualquier patente o regulación gubernamental.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] AVILÁN LUIS, LEAL FREDDY, BAUTISTA DÁMASO. Manual de Fruticultura. Principios y Manejo de la Producción. Tomo I. Segunda edición. Editorial América C.A. Caracas, Venezuela. 1992.

- [2] AVELINO WENDY, BUENAÑO WENDY, SÁNCHEZ DIANA. “Análisis del proceso de producción de la piña para aumentar la exportación del Ecuador hacia el mercado español, aplicando las normas de calidad (ISO 14001 y EUROGAP) a partir del año 2009” (Tesis, Facultad de Ciencias Humanísticas y Económicas, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Ecuador, 2009).

- [3] LEÓN JORGE. Fundamentos Botánicos de los Cultivos Tropicales. Primera Edición. Editorial IICA. Lima, Perú. 1968. Pág. 102

- [4] Programa Estratégico para el Desarrollo Rural Sustentable de la Región Sur-Sureste de México: Trópico Húmedo 2011. Paquete Tecnológico Piña MD2 (Ananas comosus var. comosus). Establecimiento y mantenimiento. Centro de Investigación Regional Golfo Centro. México. 2011.
- [5] ALVARADO WENDY. “Estudio del efecto de la deshidratación osmótica como pretratamiento para el proceso de secado por aire en piña (Ananas comosus) de variedad milagreña o perolera” (Tesis, Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Ecuador, 2009).
- [6] Unidad Técnica de Estudios Para la Industria, UTEPI. “Piña. Estudio Agroindustrial en el Ecuador: Competitividad de la Cadena de Valor y Perspectivas de Mercado”. Quito, Ecuador. 2006.
- [7] Ministerio de Agricultura y Ganadería, Costa Rica. “Características de cosecha de la piña”. [en línea]. <http://www.mag.go.cr/>. Enero 2013.

- [8] Escuela Internacional de Agricultura y Ganadería de Rivas. “Hijuelos de piña”. [en línea]. <http://www.eiag.edu.ni/>. Enero 2013
- [9] INSTITUTO NACIONAL DE ESTADISTICAS Y CENSO. Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua, ESPAC. [en línea]. <http://www.inec.gob.ec/home/>. 2011.
- [10] Oficina Comercial de Ecuador en Rusia. “Consumo de piñas en Ecuador”. [en línea]. <http://www.embajada-ecuador.ru/comercial/>. Enero 2013.
- [11] SANCHO ELLEN, BARAONA MARCIA. Piña y Papaya Fruticultura Especial, Volumen 3. Editorial EUNED. 1991.
- [12] “Piña (Ananas Comosus. Familia: Bromeliáceas)”. [en línea]. <http://www.mercasa.es/>. Enero 2013.
- [13] CASTRO MÓNICA. “Proyecto de factibilidad para la exportación de piña fresca a Bélgica, período 2010 – 2019” (Tesis, Facultad de Ciencias

Económicas y Negocios, Universidad Tecnológica Equinoccial, Ecuador, 2009).

- [14] CARVAJAL LUZ. "Producción, transformación y comercialización de pulpas de frutas tropicales". Universidad de Antioquia. Colombia. 2000.
- [15] PULIDO ANALLELI. "Estudio técnico-económico para la fabricación de bromelina". (Tesis, Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas, Instituto Técnico Nacional, México, 2007).
- [16] DUQUE CARMENZA, MORALES ALICIA. "El aroma frutal de Colombia". Universidad Nacional de Colombia. Colombia. 2005.
- [17] Biblioteca Nacional de Medicina de EE.UU. "Vitamina C". 2011. [en línea]. <http://www.nlm.nih.gov/>
- [18] MONTILLA ISABEL, FERNÁNDEZ SILVESTRE, ALCALÁ DE MARCANO DYLCIA, GALLARDO MYRIAM. El cultivo de la piña en Venezuela. Editorial IICA. Venezuela. 1977.

- [19] BULLO ADRIANA. “Aislamiento, purificación y caracterización de las endopeptidasas cisteínicas presentes en frutos de *Pseudananas macrodentes* (Morr.) Harms (Bromeliaceae)” (Tesis para optar al Doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina, 2003).
- [20] MEROPS. The Peptidasa Database. 2012. [en línea]. <http://merops.sanger.ac.uk/>.
- [21] LOPEZ LAGO I, DIAZ VARELA J, MEDINO CACERES F. La bromelina: Una proteasa de interés comercial. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, Vol. 1, No. 2. Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de Alimentos. México. 1996. Pág. 17-22.
- [22] FRANÇA-SANTOS A., ALVES R. S., LEITE N. S., FERNANDES R. P. M. “Estudos bioquímicos da enzima bromelina do *Ananas comosus* (abacaxi)”. *Universidade Federal de Sergipe. Scientia plena*, Vol. 5, No. 11. Brasil. 2009.
- [23] BIOZYM. “Bromelain”. [en línea]. <http://www.biozym.de>. Enero 2013

- [24] OBREGÓN WALTER. “Hidrolasas de látex de especies del género Araujia. Purificación y Caracterización de las enzimas proteolíticas”. (Tesis para optar al Doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina, 2008).
- [25] RAVINDRA BABU B., RASTOGI N.K., RAGHAVARAO K.S.M.S. “Liquid–liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system”. Department of Food Engineering, Central Food Technological Research Institute. Chemical Engineering and Processing 47. India. 2008. Pág. 83-89.
- [26] RATANAPONGLEKA KARNIKA. “Recovery of Biological Products in Aqueous Two Phase Systems”. Ubon Ratchathani University. International Journal of Chemical Engineering and Applications, Vol. 1, No. 2. Thailand. 2010. Pág. 191-198.
- [27] Prácticas de biomoléculas. Departamento de Biología Molecular y Bioquímica. [en línea]. <http://www.biorom.uma.es/indices/index.html>

- [28] Métodos de determinación de proteínas totales. Bioquímica humana. Facultad de medicina. Universidad de Buenos Aires. 2010. [en línea]. <http://www.fmv-uba.org.ar>.
- [29] FERNANDÉZ EMILIO, GALVÁN AURORA. “Métodos para la Cuantificación de Proteínas”. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Campus Universitario Rabanales. Universidad de Córdoba. Argentina.
- [30] SINCHE VINICIO. “Aislamiento, purificación parcial y caracterización cinética de las proteasas presentes en el látex de los frutos de una planta del género Vasconcella”. (Tesis, Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria, Escuela Politécnica Nacional, Ecuador, 2009).
- [31] CALKINS CHRIS, SULLIVAN GARY. “Adding Enzymes to Improve Beef Tenderness”. University of Nebraska. 2007.
- [32] ENZYME DEVELOPMENT CORPORATION. “Bromelain”. [en línea]. <http://www.enzymedevelopment.com/>. Diciembre 2012

- [33] TERRONI EQUIPAMENTOS LTDA. Manual básico de liofilización. Paraná, Brasil.
- [34] PARZANESE MAGALI. “Tecnologías para la Industria Alimentaria. Liofilización de alimentos”. Ficha N°3. [en línea]. <http://www.alimentosargentinos.gov.ar/>. Febrero 2013.
- [35] GEA Process Engineering. “Liofilización”. [en línea]. <http://www.gea-pe.com.ar/>. Febrero 2013.
- [36] BHATTACHARYYA BARUN. “Bromelain: An Overview”. Natural Product Radiance, Vol. 7(4). India. 2008. Pág. 359-363.
- [37] HERNÁNDEZ MARTHA, CARVAJAL CAROL, MÁRQUEZ MARGARITA, BÁEZ ROXANA, MORRIS HUMBERTO, SANTOS RAMÓN, CHÁVEZ MARÍA. “Obtención de preparados enzimáticos a partir de tallos de piña (*Ananas comosus*) con potencialidades de uso en la biotecnología y la medicina”. Revista CENIC Ciencias Biológicas, Vol. 36, No. Especial. Cuba. 2005.

- [38] MONTGOMERY DOUGLAS, RUNGER GEORGE. Probabilidad y Estadística Aplicada a la Ingeniería. Primera edición. Editorial Mc Graw Hill. México. 1996.
- [39] MORALES MADELAIDE, HERNÁNDEZ MARIA, CABEZAS MARCO, BARRERA JAIME, MARTÍNEZ ORLANDO. “Caracterización de la maduración del fruto de piña nativa (*Ananas comosus* L. Merrill) cv. India”. Agronomía Colombiana, Vol. 18, No. 1-2. Colombia. 2001. Pág. 7-13.
- [40] PROGRAMA COOPERATIVO DE INVESTIGACIÓN Y TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA PARA LA SUBREGIÓN ANDINA PROCIANDINO. Manejo Pre Y Post-Cosecha De Frutales Y Hortalizas Para Exportación. Editorial IICA. Ecuador. 1996.
- [41] KETNAWA S., CHAIWUT P., RAWDKUEN S. “Extraction of bromelain from pineapple peels”. Food Science and Technology International. 2011.

- [42] GALLARDO LINDA, SÁNCHEZ ALFREDO, MONTALVO CLAUDIA, ALONSO ALEJANDRO. "Extracción de bromelina a partir de residuos de piña". Universidad Politécnica de Puebla. México.
- [43] "Extracción, cuantificación, identificación y determinación de la actividad enzimática de la bromelina contenida en el tallo del cultivo de Ananas comosus, comúnmente conocido como piña". [en línea]. <http://www.acmor.org.mx/>. Diciembre 2012.
- [44] GAUTAM S. S., MISHRA S. K., DASH V., GOYAL AMIT K., RATH G. "Comparative study of extraction, purification and estimation of bromelain from stem and fruit of pineapple plant". Thai J. Pharm. Sci. No. 34. India. 2010. Pág. 67-76.
- [45] MASDOR, SAID. "Partial purification of crude stem bromelain improves its sensitivity as a protease inhibitive assay for heavy metals". Australian Journal of Basic and Applied Sciences Vol 5, No 10. Malaysia. 2011. Pág. 1295-1298.

- [46] SOARES PAULO, COELHO DIEGO, MAZZOLA PRISCILA, SILVEIRA EDGAR, CARNEIRO-DA-CUNHA MARIA DAS GRAÇAS, PESSOA ADALBERTO, TAMBOURGI ELIAS. "Studies on Bromelain Precipitation by Ethanol, Poly (Ethylene Glycol) and Ammonium Sulphate". Chemical Engineering Transactions, Vol. 24. 2011. Pág. 979-984
- [47] FREITAS COELHO DIEGO DE, SOARES PAULO, SILVEIRA EDGAR, PESSOA ADALBERTO, BASILE ELIAS. "Purificação de bromelina dos resíduos de abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill) por sistemas bifásicos aquosos PEG/Sal". Exacta, Vol. 9, No. 3. São Paulo, Brasil. 2011. Pág. 333-338.
- [48] MURWAN SABAHELKHIER K., SAIFELDIN HUSSAIN A., ISHAG K. E. A. "Effect of maturity stage on protein fractionation, *in vitro* protein digestibility and anti-nutrition factors in pineapple (*Ananas comosis*) fruit grown in Southern Sudan". African Journal of Food Science, Vol. 4, No. 8. Sudan. 2010. Pág. 550-552.
- [49] HERNÁNDEZ MARTHA, CARVAJAL CAROL, MÁRQUEZ MARGARITA, CHÁVEZ MARÍA. "Aislamiento de enzimas proteolíticas a

partir de restos de cosecha de piña”. Cultivos Tropicales, Vol. 5, No. 4.

La Habana, Cuba. 2004. Pág. 95-102.