



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE INGENIERIA QUIMICA

Cuantificación de la bromelina extraída de las cáscaras, corona y tallo de la piña por el método de bradford.

**CAMPOVERDE LEON JUAN ANDRES
INGENIERO QUIMICO**

**SIGSIG CABRERA DIANA JANNETH
INGENIERA QUIMICA**

**MACHALA
2024**



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE INGENIERIA QUIMICA

Cuantificación de la bromelina extraída de las cáscaras, corona y tallo de la piña por el método de bradford.

**CAMPOVERDE LEON JUAN ANDRES
INGENIERO QUIMICO**

**SIGSIG CABRERA DIANA JANNETH
INGENIERA QUIMICA**

**MACHALA
2024**



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE INGENIERIA QUIMICA

TRABAJOS EXPERIMENTALES

Cuantificación de la bromelina extraída de las cáscaras, corona y tallo de la piña por el método de bradford.

**CAMPOVERDE LEON JUAN ANDRES
INGENIERO QUIMICO**

**SIGSIG CABRERA DIANA JANNETH
INGENIERA QUIMICA**

SAN MARTIN TORRES DELLY MARIBEL

**MACHALA
2024**

CUANTIFICACIÓN DE LA BROMELINA EXTRAÍDA DE LAS CÁSCARAS, CORAZÓN Y TALLO DE LA PIÑA POR EL MÉTODO DE BRADFORD



Nombre del documento: final_juan.docx
 ID del documento: e5a93c4ae236ce8320b354e5886528957d15b3ff
 Tamaño del documento original: 4,66 MB
 Autores: Juan Andrés Campoverde León, Diana Janneth Sigsig Cabrera

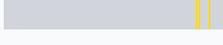
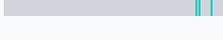
Depositante: San Martin Torres Delly Maribel
 Fecha de depósito: 18/2/2025
 Tipo de carga: interface
 fecha de fin de análisis: 18/2/2025

Número de palabras: 12.614
 Número de caracteres: 82.391

Ubicación de las similitudes en el documento:



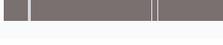
Fuentes principales detectadas

N°	Descripciones	Similitudes	Ubicaciones	Datos adicionales
1	 respyn.uanl.mx https://respyn.uanl.mx/index.php/respyn/article/view/682 10 fuentes similares	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (61 palabras)
2	 repositorio.uta.edu.ec https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/39210/1/CAL_060.pdf 8 fuentes similares	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (58 palabras)
3	 www.redalyc.org Aprovechamiento de subproductos de la industria agroalimentar... https://www.redalyc.org/journal/813/81373798002/ 1 fuente similar	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (69 palabras)
4	 actualfruveg.com La piña, fruta tropical apreciada por su sabor-Nutrición-ACTUAL ... https://actualfruveg.com/2022/02/25/pina-fruta-tropical-aroma-saboriar/ 5 fuentes similares	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (49 palabras)
5	 dspace.esPOCH.edu.ec http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/22938/1/27T00778.pdf	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (60 palabras)

Fuentes con similitudes fortuitas

N°	Descripciones	Similitudes	Ubicaciones	Datos adicionales
1	 Documento de otro usuario #507cd6 El documento proviene de otro grupo	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (40 palabras)
2	 repositorio.utC.edu.ec Evaluación de las actividades biológicas in vitro de los aisa... http://repositorio.utC.edu.ec/bitstream/27000/8126/6/MUTC-001035.pdf.txt	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (40 palabras)
3	 www.academia.edu (PDF) Caracterización Físico-Químico de la cáscara de piña (An... https://www.academia.edu/109665422/Caracterización_Físico_Químico_de_la_cáscara_de_piña_A...	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (36 palabras)
4	 doi.org https://doi.org/10.1007/s11244-022-01770-8	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (31 palabras)
5	 www.redalyc.org Aprovechamiento de subproductos de la industria agroalimentar... https://www.redalyc.org/journal/813/81373798002/	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (36 palabras)

Fuentes ignoradas Estas fuentes han sido retiradas del cálculo del porcentaje de similitud por el propietario del documento.

N°	Descripciones	Similitudes	Ubicaciones	Datos adicionales
1	 Tesis arreglo de estructura - JC.docx Tesis arreglo de estructura - JC #0f51d4 El documento proviene de mi grupo	94%		Palabras idénticas: 94% (11.869 palabras)
2	 Tesis arreglo de estructura - JC.docx Tesis arreglo de estructura - JC #afc562 El documento proviene de mi grupo	93%		Palabras idénticas: 93% (11.867 palabras)

Fuentes mencionadas (sin similitudes detectadas) Estas fuentes han sido citadas en el documento sin encontrar similitudes.

-  https://doi.org/10.1080/11358129609487552
-  https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115237
-  https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108988
-  https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126154

CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

Los que suscriben, CAMPOVERDE LEON JUAN ANDRES y SIGSIG CABRERA DIANA JANNETH, en calidad de autores del siguiente trabajo escrito titulado CUANTIFICACIÓN DE LA BROMELINA EXTRAÍDA DE LAS CÁSCARAS, CORAZÓN Y TALLO DE LA PIÑA POR EL MÉTODO DE BRADFORD, otorgan a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tienen potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

Los autores declaran que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

Los autores como garantes de la autoría de la obra y en relación a la misma, declaran que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asumen la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.

CAMPOVERDE LEON JUAN ANDRES

0706531407

SIGSIG CABRERA DIANA JANNETH

0705822443

DEDICATORIA

El siguiente trabajo de titulación va dedicado a mis hijos Thiago y Juan Andrés, quienes han sido mis fuerzas para poder lograr cumplir esta meta. A mi esposa Vanessa Prado, quién ha estado apoyándome constantemente, evitando que desiste incluso aún en momentos difíciles.

A mis padres Amanda León y Giovanni Campoverde, quienes me guiaron con consejos y buenos deseos, siempre alentándome a mejorar como ser humano y cumplir mis objetivos de vida. A mis hermanos Giovanni y Donnys, para que sirva de ejemplo que todo en la vida se puede lograr, con esfuerzo y disciplina.

A mis abuelos Esperanza Pardo y Julio Campoverde, quienes con sus consejos y amor supieron inculcarme ese deseo de superación, sin hacer las cosas mal, se lo dedico quienes junto con mi hermano Giovanni partieron de este mundo, y están desde ese lugar bonito cuidándome y guiándome.

Juan Andrés Campoverde León

Con el corazón lleno de gratitud y amor, dedico este trabajo de titulación a las personas más importantes en mi vida, quienes han sido mi fuente constante de inspiración y apoyo incondicional a lo largo de este arduo pero gratificante camino:

A mis amados padres, Jesús Sigsig y María Cabrera, pilares fundamentales de mi existencia. Sus manos trabajadoras y corazones generosos han moldeado la persona que soy hoy. Su sacrificio y esfuerzo incansable para brindarme una educación de calidad son el motor que impulsa mis sueños y metas. Cada uno de sus consejos, palabras de aliento y muestras de cariño han sido la luz que guía mi camino.

A mis queridos hermanos, Mishel y Kevin, compañeros de vida y confidentes incondicionales. Su apoyo inquebrantable y aliento constante han sido mi mayor motivación en los momentos más desafiantes. Gracias por creer en mí incluso cuando yo dudaba de mí mismo.

Diana Janneth Sigsig Cabrera

AGRADECIMIENTO

Primeramente, agradezco a Dios por la vida y salud que día a día me brinda, por la oportunidad de lograr cumplir una meta más.

Agradezco a mis tutores, Ing. Quim. Delly Maribel San Martín Torres, Mgs., e Ing. Alim. José Humberto Ayala Armijos, Mgs., quienes con sus conocimientos y experiencia supieron guiarme en el desarrollo del presente trabajo de titulación y poder así lograr culminar mi carrera profesional.

Finalmente, agradezco a la Universidad Técnica de Machala por ser esa Alma Mater que me brindó experiencias gratas, los recursos para poder formarme con un profesional.

Juan Andrés Campoverde León.

En primer lugar, expreso mi más sincero agradecimiento mis tutores, Ing. Delly San Martín e Ing. Humberto Ayala, quienes, con su sabiduría, paciencia y compromiso, me han guiado a lo largo de este proceso. Gracias a sus enseñanzas y dedicación, he podido alcanzar mis objetivos y culminar con éxito este importante trabajo.

A la Universidad Técnica de Machala, mi segundo hogar, mi gratitud es eterna. Gracias por abrirme sus puertas y brindarme una formación académica de excelencia. Sus aulas fueron el escenario donde cultivé mis conocimientos, crecí como profesional y descubrí mi vocación.

Finalmente, expreso mi más sincero agradecimiento a aquellas personas que fueron fundamentales en mi vida académica, quienes, con su amistad y apoyo incondicional, me acompañaron a lo largo de este camino: Juan Campoverde. y Doménica Gómez.

Diana Janneth Sigsig Cabrera.

RESUMEN

La bromelina es una enzima proteolítica presente en la piña (*Ananas comosus*), con aplicaciones en industrias farmacéuticas, alimentarias y biotecnológicas. El estudio se enfocó en la extracción de bromelina de los residuos de piña, como cáscaras, corazón y tallo, para valorizar estos subproductos y reducir el impacto ambiental. El método de Bradford fue empleado para la cuantificación de proteínas, debido a su simplicidad, rapidez y bajo costo.

El proceso experimental incluyó el pretratamiento físico-químico de las muestras, la extracción de bromelina utilizando citrato de sodio, la purificación mediante precipitación con sulfato de amonio, y la cuantificación de la enzima mediante espectrofotometría UV-visible. Además, se evaluó la actividad enzimática de la bromelina utilizando albúmina de huevo como sustrato.

Los resultados denotaron que el tallo de la piña presentó la mayor concentración de bromelina (2.0373 mg/L), seguido de las cáscaras (1.7850 mg/L) y el corazón (1.6357 mg/L). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas, confirmando que el tallo es la fuente más eficiente para la extracción de bromelina. En cuanto a la actividad enzimática, la cáscara mostró la mayor capacidad de hidrólisis de proteínas, alcanzando su punto máximo a los 30 minutos (0.1979 ppm), seguida del corazón (0.1838 ppm) y el tallo (0.1489 ppm). Sin embargo, la actividad enzimática del tallo fue más estable a lo largo del tiempo, lo que sugiere ventajas en aplicaciones industriales que requieren una actividad prolongada.

El estudio evidencia que el tallo de la piña es la fuente más rica en bromelina, pero las cáscaras y el corazón también pueden ser aprovechados como subproductos para la extracción de esta enzima, contribuyendo a la valorización de residuos agrícolas y a la reducción del impacto ambiental. Se recomienda realizar estudios adicionales para optimizar los parámetros de extracción y purificación, así como validar los resultados con técnicas analíticas más avanzadas.

Palabras clave: Bromelina, extracción, actividad enzimática, Albúmina Sérica Bovina (BSA), método de Bradford.

ABSTRACT

Bromelain is a proteolytic enzyme present in pineapple (*Ananas comosus*), with applications in pharmaceutical, food and biotechnological industries. The study focused on the extraction of bromelain from pineapple residues, such as peels, core and stem, to valorize these by-products and reduce the environmental impact. The Bradford method was used for protein quantification, due to its simplicity, speed and low cost.

The experimental process included physicochemical pretreatment of the samples, extraction of bromelain using sodium citrate, purification by precipitation with ammonium sulfate, and quantification of the enzyme by UV-visible spectrophotometry. In addition, the enzymatic activity of bromelain was evaluated using egg albumin as a substrate.

The results showed that the pineapple stem presented the highest bromelain concentration (2.0373 mg/L), followed by the peels (1.7850 mg/L) and the core (1.6357 mg/L). These differences were statistically significant, confirming that the stem is the most efficient source for bromelain extraction.

In terms of enzymatic activity, the peel showed the highest protein hydrolysis capacity, reaching its peak at 30 minutes (0.1979 ppm), followed by the heart (0.1838 ppm) and the stem (0.1489 ppm). However, the enzymatic activity of the stem was more stable over time, suggesting advantages in industrial applications requiring prolonged activity.

The study shows that the pineapple stem is the richest source of bromelain, but the peels and core can also be used as by-products for the extraction of this enzyme, contributing to the valorization of agricultural residues and the reduction of environmental impact. Further studies are recommended to optimize the extraction and purification parameters, as well as to validate the results with more advanced analytical techniques.

Keywords: Bromelain, extraction, enzyme activity, Bovine Serum Albumin (BSA), Bradford's method.

CONTENIDO

	Pág.
DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTO	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN.....	12
OBJETIVOS	14
Objetivo general	14
Objetivos Específicos	14
1. MARCO TEÓRICO	15
1.1 Piña.....	15
1.1.1 Definición.....	15
1.1.2 Taxonomía de la Piña	15
1.1.3 Morfología de la Piña	16
1.1.4 Clasificación.....	16
1.1.5 Tipos de Piñas.....	16
1.1.6. Condiciones de Cultivo	18
1.1.7 Composición Física y Química de la piña.....	19
1.1.8 Cáscaras, corona y tallo de piña como fuente de bromelina.....	20
1.2 Bromelina	21
1.2.1 Peso molecular, pH óptimo, temperatura óptima, estabilidad.	22
1.2.2 Propiedades químicas.	22
1.2.3 Mecanismo de acción y especificidad.	23
1.2.4 Hidrólisis de enlaces peptídicos.	24
1.2.5 Sitio activo y sustratos específicos.....	24
1.2.6 Aplicaciones en diversas áreas.....	24
1.3 Extracción y purificación de proteínas.....	25
1.3.1 Extracción.....	25
1.3.2 Efecto del pH.....	26
1.3.3 Extracción con citrato de sodio.	26
1.3.4 Purificación	26
1.4 Cuantificación de proteínas.....	27
1.4.1 Método de Bradford para la cuantificación de prótidos.	27

1.5 Determinación de actividad Enzimática.....	28
1.5.1 Actividad enzimática	28
1.5.2 Factores que afectan la actividad enzimática.	28
1.5.3 Liofilización	29
2. METODOLOGÍA.....	30
2.1 Sujetos o unidades de análisis.....	30
2.1.1 Población.....	30
2.1.2 Ubicación de la investigación	30
2.2 Materiales y métodos.....	30
2.2.1 Materiales, equipos y reactivos	30
2.2.2 Pre tratamiento Físico.....	31
2.2.3 Extracción.....	32
2.2.4 Purificación	33
2.2.5 Método de Bradford.	33
2.2.5 Actividad Enzimática.....	34
2.4 Variables de Investigación	36
2.4.1 Variables dependientes.....	36
2.4.2 Variables independientes.....	36
2.5 Diseño experimental	36
2.6 Análisis de datos	36
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
3.1 Tratamientos Fisicoquímicos para la extracción de Bromelina	37
3.2 Concentración de Bromelina.....	43
3.3 Actividad Enzimática.....	46
3.4 Cinética de la reacción enzimática.....	46
CONCLUSIONES.....	49
RECOMENDACIONES.....	50
BIBLIOGRAFÍA.....	51
ANEXOS	58

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Piña tipo Cayena Lisa o Hawaiana	17
Figura 2. Piña tipo Golden Sweet o MD2.....	17
Figura 3. Piña tipo Perolera o Milagreña	18
Figura 4. Estructura de la enzima bromelina	22
Figura 5. Mecanismo de acción de la bromelina.....	24
Figura 6. Actividad Enzimática	28
Figura 7. Factores que afectan la actividad enzimática	28
Figura 8. Ubicación geográfica del lugar de materia prima	30
Figura 9. Pre tratamiento de materia prima	32
Figura 10. Diagrama de flujo de extracción de bromelina por el método de Bradford .	34
Figura 11. Actividad enzimática de la bromelina con ovoalbúmina	35
Figura 12. Balance de masa de la piña	37
Figura 13. Curva de Calibración de Albúmina Sérica Bovina (BSA)	41
Figura 14. Concentración de bromelina (mg/ml).....	43
Figura 15. Diagrama de Cajas y Bigotes de Concentración de Bromelina vs Sustratos	45
Figura 16. Actividad enzimática de la bromelina.....	47

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación taxonómica de la piña	15
Tabla 2. Clasificación de la piña	16
Tabla 3. Parámetros Fisicoquímicos.....	19
Tabla 4. Distribución de la bromelina en la piña.....	21
Tabla 5. Composición química de la piña en su estado verde y madura	23
Tabla 6. Reactivos, equipos y materiales de laboratorio	31
Tabla 7. Diseño factorial – Muestras	36
Tabla 8. Valores de Absorbancia en muestra de Cáscaras de piña	40
Tabla 9. Valores de Absorbancia en muestra de Corazón de piña.....	40
Tabla 10. Valores de Absorbancia en muestra de Tallo de piña	40
Tabla 11. Curva de calibración de Albúmina Sérica Bovina (BSA).....	41
Tabla 12. Media y desviación de la bromelina en cada tipo de sustrato	42
Tabla 13. Concentración de Bromelina en cada sustrato	43
Tabla 14. Anova One Way de Concentración de Bromelina	44
Tabla 15. Índice de cristalinidad de películas.....	44
Tabla 16. Anova one way de la actividad enzimática de la bromelina	48

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Recepción de Materia prima	58
Anexo B. Extracción y Filtración de las materias primas	58
Anexo C. Aplicación del Reactivo de Bradford	59
Anexo D. Centrifugado de las muestras	59
Anexo E. Liofilizado de Albúmina de Huevo para medir eficiencia enzimática de las muestras	60
Anexo F. Análisis de absorbancia de las muestras en el Espectrofotómetro de UV visible a 290nm.....	60
Anexo G. Absorbancia resultante de las muestras en el espectrofotómetro uv visible	61

INTRODUCCIÓN

La piña (*Ananas comosus*) es una de las frutas tropicales más cultivadas y consumidas a nivel mundial, no solo por su valor nutricional y su sabor característico, sino también por su potencial industrial debido a la presencia de enzimas proteolíticas como la bromelina. Esta enzima, identificada por primera vez en 1891 por el químico venezolano Vicente Marcano, ha ganado relevancia en diversas industrias debido a su capacidad para degradar proteínas, lo que la convierte en un componente clave en aplicaciones farmacéuticas, alimentarias y biotecnológicas.^{1,2} La bromelina se encuentra principalmente en el tallo de la piña, aunque también está presente en menor concentración en las cáscaras y el corazón del fruto³. Sin embargo, la extracción y cuantificación precisa de esta enzima siguen siendo un desafío, ya que su rendimiento depende de factores como el método de extracción, los pretratamientos aplicados y la estabilidad enzimática.⁴

En el contexto actual, donde la sostenibilidad y la valorización de residuos agrícolas son prioridades globales, el aprovechamiento de los subproductos de la piña, como las cáscaras, el corazón y el tallo, representa una oportunidad significativa para reducir el impacto ambiental y generar productos de alto valor agregado. Según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura⁵, se estima que alrededor del 30-40% de la producción mundial de piña se convierte en residuos durante su procesamiento, lo que genera un problema ambiental debido a la acumulación de desechos orgánicos. La extracción de bromelina de estos residuos no solo contribuiría a minimizar este impacto, sino que también permitiría obtener una enzima con múltiples aplicaciones industriales.^{2,6}

La bromelina es una mezcla de enzimas proteolíticas, principalmente cisteín-proteasas, que actúan rompiendo enlaces peptídicos en proteínas, lo que la hace útil en procesos como la clarificación de bebidas, el ablandamiento de carnes y la fabricación de suplementos digestivos.⁷ Además, sus propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas y anticancerígenas han sido ampliamente estudiadas, lo que ha impulsado su uso en la industria farmacéutica.⁸ Sin embargo, la eficiencia de la bromelina en estas aplicaciones depende en gran medida de su pureza y actividad enzimática, lo que resalta la importancia de desarrollar métodos de extracción y cuantificación precisos y eficientes. Una de las metodologías que más se utilizan en la contabilidad proteica, incluida la bromelina, es el método de Bradford, basado en la formación de un complejo colorimétrico entre el azul de Coomassie G-250 y las proteínas.⁹ Este método es ampliamente preferido debido a su simplicidad, rapidez y bajo costo, aunque su

precisión puede verse afectada por la presencia de interferentes en matrices complejas, como las extracciones de bromelina.¹⁰ Además, la combinación de este método con técnicas avanzadas, como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), ha permitido obtener resultados más confiables en la caracterización de enzimas.¹¹

En este contexto, el presente estudio tiene como objetivo cuantificar la concentración de bromelina extraída de las cáscaras, el corazón y el tallo de la piña mediante el método de Bradford, evaluar su actividad enzimática y comparar su rendimiento en función de las fuentes de extracción y las condiciones experimentales.^{12,14} La elección de estas partes de la piña se debe a su disponibilidad como residuos en la industria alimentaria y a su potencial para ser valorizados en procesos industriales. Además, se busca contribuir al desarrollo de técnicas confiables y accesibles para la caracterización y aprovechamiento de la bromelina, promoviendo así la sostenibilidad en el sector agrícola y agroindustrial.^{13,15}

La relevancia de este estudio radica en su enfoque integral, que no solo aborda la cuantificación de la bromelina, sino también la evaluación de su actividad enzimática y la comparación de su rendimiento en diferentes partes de la piña. Esto permitirá identificar la materia prima más adecuada para la extracción de la enzima y establecer un protocolo eficiente y reproducible para su obtención.¹⁶ Además, los resultados obtenidos podrían ser utilizados como base para futuras investigaciones enfocadas en la optimización de procesos de extracción y purificación de bromelina, así como en su aplicación en diversas industrias.

Este trabajo de investigación busca no solo generar datos confiables y actualizados sobre la concentración y actividad de la bromelina en diferentes partes de la piña, sino también promover el desarrollo de procesos industriales más sostenibles y económicamente viables. La valorización de los residuos de piña a través de la extracción de bromelina representa una solución ecológica y rentable, que contribuye a la reducción del impacto ambiental y al aprovechamiento integral de los recursos agrícolas.¹⁷

OBJETIVOS

Objetivo general

Cuantificar la concentración de bromelina extraída de las cáscaras, el corazón y el tallo de la piña mediante el método de Bradford, evaluar su actividad enzimática y comparar su rendimiento en función de las fuentes de extracción y las condiciones experimentales.

Objetivos Específicos

- Aplicar tratamientos físico-químicos para extraer bromelina de la cáscaras, corazón y tallo de la piña (ananá).
- Aplicar el método de Bradford para cuantificar la bromelina de las cáscaras, corazón y tallo de la piña.
- Valorar la actividad enzimática proteolítica adquirida de las cáscaras, corona y tallos de la piña.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Piña

1.1.1 *Definición.* Fruto originario de zonas tropicales de la parte sur del continente americano, países como Brasil, Indonesia, Costa Rica, otros, consumida de forma fresca o procesarse de diversas maneras. Se encuentra dentro de los tres lugares productivos de todas las variedades frutales producidas en las regiones trópicas, siendo el banano, la naranja y el limón quienes ocupan los dos lugares líderes.¹⁸ En el mundo la demanda de esta fruta sigue en aumento, siendo los potenciales productores países como Indonesia y Costa Rica que poseen un valor productivo por encima de los 120 y 75 ha.¹⁹

Su forma frutal se asemeja a un cilindro, con gran contenido de fibra y su gran aromaticidad, suele ser cultivada en alturas superiores a los 0.8 km y 1.2 km por encima del nivel del mar. Exige un terreno con permeabilidad del viento, y una medida de pH de 5 – 5.2, es decir ácido.²⁰

La piña caracterizada por ser un fruto de la zona trópica del Ecuador, sus zonas productivas pertenecen a la región costera del país, siendo tales como la provincia del Guayas, Sto. Domingo, El Oro, Esmeraldas y la provincia Manabita. La capacidad productiva de la cada provincia se da en el orden mencionado, estas zonas poseen el hábitat y recursos óptimos que necesita esta fruta para su desarrollo, provocando que su calidad sea excelente y permita ser objeto de exportación.²⁰

1.1.2 *Taxonomía de la Piña.* La clasificación taxonómica se presenta de forma detallada en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la piña

Reino	Planta
Subreino	<i>Tracheobionta</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Lilopsida</i>
Subclase	<i>Commelinidae</i>
Orden	<i>Bromeliales</i>
Familia	<i>Bromeliaceae</i>
Subfamilia	<i>Bromelioideae</i>
Género	<i>Ananas</i>
Especies	<i>Comosus</i>

Fuente: ⁸

1.1.3 *Morfología de la Piña.* La piña (*Ananas Comosus*) morfológicamente está conformada por:

1.1.3.1 *Raíces.* Posee una variedad como las de primer orden que vienen de la parte embrionaria del grano, las esporádicas que emergen de las hojas o el tallo y las de segundo orden que crecen de otras raíces. Sus raíces son breves, flacas y con ramificaciones desarrolladas de la zona soporte del vástago, y crecen en el mismo soporte. Tienen un despliegue de casi 2 metros, por lo general se encuentra a sólo 0,3 metros del suelo.

1.1.4 *Clasificación.* Por lo general estas variedades pertenecen a la generación de Ananas especialmente las comestibles, su clasificación de acuerdo a lo manifestado en la Tabla 2 es la forma siguiente:

Tabla 2. Clasificación de la piña

No.	Especies
1	<i>Ananas comosus</i> (L.) Merrill <i>Ananus comosus var. ananassoides</i> (Baker) <i>Ananas comosus var. bracteatus</i> (Lindl.) <i>Ananas comosus var. comosus</i> <i>Ananas comosus var. erectifolius</i> (LB Smith) <i>Ananas comosus var. paraguayensis</i> (Camargo y LB Smith)
2	<i>Ananas macrodontes</i> (Morren)

Fuente:²¹

1.1.5 *Tipos de Piñas.* En la actualidad esta fruta abarca alrededor de 56 tipos de géneros y 3000 especies destacándose las A. Sativus, A. comosus, y las A. lucidus.

Según el III censo Agropecuario nacional en el año 2000, en Ecuador existe aproximadamente 5.570 hectáreas superficies dedicadas al cultivo de piña. Las principales variables cultivadas en Ecuador son la champaca, la extradulce o MD2 y la Perolera o Milagreña.²²

1.1.5.1 *Cayena Lisa O Hawaiana.* Cayena lisa, también llamada “Champaca” o “Hawaiana” (Figura 1), tiene su procedencia en Guyana. Dada a su apariencia tubular y características singulares como la parte comestible de color amarillo, que es

fundamental en la producción de alimentos enlatados y en la industria alimentaria universal.²⁴

Figura 1. Piña tipo Cayena Lisa o Hawaiana



Fuente: ²⁴

1.1.5.2 *Golden Sweet*. Denominada por DOLE como “MD2” (Figura 2). Esta variedad de piña tiene una gran resistencia en cuanto a la proliferación de microorganismos, aumentando su vida útil, apetecida en el continente europeo y americano.²⁵ En la región de los Tsáchilas se logra apreciar cantidades extensas de esta diversidad, la cual tiene una gran salida a nivel mundial.²⁴

Figura 2. Piña tipo Golden Sweet o MD2



Fuente: ²⁴

1.1.5.3 *Perolera*. También conocida como “Milagreña” (Figura 3). Estas piñas logran alcanzar un valor en su contenido Brix de 14-17 °, y un mayor contenido de nutrientes que el resto. ²⁶Esta diversidad tiene su origen en el país brasilero, siendo la mayor variedad sembrada en el lugar, abarcando entre las 900 a 1.200 hectáreas. ²⁴

Figura 3. Piña tipo Perolera o Milagreña



Fuente: ²⁴

1.1.6. *Condiciones de Cultivo*. Las condiciones de cultivo son cruciales para el sembrado de la piña para que así el fruto alcance su máxima potencial de crecimiento y calidad.

1.1.6.1 *Suelo*. El suelo necesario para el cultivo de la piña debe contar con un gran drenaje, siendo el suelo franco el- más adecuado para el cultivo de la piña, al ser una combinación de arena, limo y arcilla, componentes ideales para el cultivo, el pH que debe presentar es de 5 a 6. ²⁷

1.1.6.2 *Temperatura*. El clima idóneo en producción de este fruto es un ambiente cálido debido a que esta planta seda en temperaturas que varían entre de los 20 a 30 °C, la temperatura óptima va desde los 24 a los 29 °C, si el rango de temperatura es mayor a 30° C el cultivo se verá totalmente afectado.²⁸

1.1.6.3 *Humedad*. Según Muñoz Nayely (2023) manifiesta que el cultivo de piña requiere que tenga un ambiente con una humedad relativa entre 70 y 90 °C. ²⁷

1.1.6.4 *Luminosidad*. La luminosidad elevada puede ser un factor positivo para la piña, pero el uso excesivo de ella suele traer consecuencias, las hojas pueden cambiar el color y el fruto puede quemarse, la baja luminosidad acostumbra a causar pérdidas como la reducción peso de la fruta a un 10 %. ²⁸ La radiación solar provoca un daño

exponencial a la planta durante su etapa florativa, decreciendo la calidad de la planta y fruto, lo que es directamente proporcional a su valor comercial.²⁹

1.1.6.5 *Precipitación*. Según el Grupo de Investigación Agricultura y Desarrollo Sustentable (2020) menciona que, las altitudes superiores 1,2 kilómetros sobre el nivel del mar pueden producir daños críticos a los cultivos de piña.³⁰ Es por ello por lo que la altura es aquella que está por debajo del valor descrito para poder asegurar el ataque de insectos o enfermedades que degraden el estado de la fruta.³⁰ Un suelo saturado limita la acción de crecimiento vegetal, disminuyendo los azúcares contenidos en el producto, un drenado correcto del suelo evita la acumulación de aguas que sirven como fuente de crecimiento y desarrollo de especies fúngicas.²⁹

1.1.7 *Composición Física y Química de la piña*

1.1.7.1 *Parámetros físicos*. Los parámetros físicos y químicos de la piña son una serie de variables, las cuales están ponderadas con una cantidad o valor, en una unidad determinada para describir una magnitud física manifestada en la Tabla 3.

Tabla 3. Parámetros Físicoquímicos

Parámetro fisicoquímico	Valor
Grados Brix	10-17
Acidez titulable (% ac. cítrico)	0.6-1.6
% de cenizas	0.3-0.4
% de agua	81-86
% de fibra	0.3-0.6
% de nitrógeno	0.045-0.115
Ésteres (ppm)	1-250
Pigmentos (ppm de carotenos)	0.2-2.5
% en peso de glucosa	1-3
% en peso de fructosa	0.6-2.3
% en peso de sacarosa	5.9-12
% de almidón	< 0.002
% de celulosa	0.43-0.54
% de hexosas	0.10-0.15
% de pentosas	0.33-0.43

Fuente: ³¹

1.1.7.2 *Composición química de la piña.* Su componente activo es duplicado al fin del tiempo de madurez, generando productos con deficiencia de fuentes nutricionales. Según estudios realizados por laboratorios de Estados Unidos por cada 100 g de piña contienen 10% de azúcar y 0,54 g de proteína, aunque la variedad Hawaiana posee un 2% más de sacarosa que las demás variedades.³²

Después de la cosecha, el contenido de sacarosa aumenta hasta un 14,6% en los 5 días siguientes, pero, tras este tiempo hasta el día 15, comienza a disminuir su contenido de sacarosa hasta llegar a un 10,57% y aparece la senescencia. Cuando comienza la maduración el contenido de proteasa aumenta, por lo general esto comienza a partir del tercer o quinto día.³² Una piña empieza a degradar sus componentes, nutrientes y eliminar su contenido de agua posterior a los 20 días de cosechada, puesto que las condiciones de ambiente no son las ideales. Se genera un proceso de fermentación acética, emanando olores fuertes, y derramando un lixiviado de carácter ácido, cambiando, el físico de la piña de un tomo verde amarillento a un tono ámbar, con piel corrugada o blanda, con interior viscoso o pegajoso, con olor desagradable.³³

1.1.8 *Cáscaras, corona y tallo de piña como fuente de bromelina.* Esta enzima se encuentra en el vástago y en cantidades pequeñas en los derivados de esta fruta. Las características biológicas de los componentes presentes en la fruta ofrecen una nueva oportunidad para desarrollar productos de valor añadido destinados para el consumo humano.³⁴ La producción industrial se enfoca en extraer esta enzima proteolítica del tallo, ya que se considera un derivado de su aprovechamiento. Sin embargo, este proceso también puede darse aprovechando otras partes de la planta y el fruto, como las hojas y la corteza o cascara.²⁴

La corona se encuentra en la superficie de la fruta y representa el tejido meristemático de la planta. Al cosechar el fruto, se incluye la corona en la comercialización. Tomando en cuenta que este material se lo utiliza solo en las procesadoras de la localidad. En el proceso de selección deben descartarse las coronas demasiado pequeñas, las que carezcan de cogollo y las que presenten varios brotes. La enzima separada del vástago y del fruto se les consigna valores nuevos de enzimas: EC3.4.22.32 Y EC3.4.22.33, respectivamente.¹ El fermento refinado de la fruta es un tior proteasa de medio acidulado, que pertenece a los miembros de la papaína. Refiriéndose a una glicoproteína, normalmente uniforme, cuya composición química queda reflejada en la siguiente Tabla 4.

La enzima proteolítica del vástago (Stem Bromelain) es, un prótido de características básicas con un aporte de carbohidratos de 1.46% y con una mínima acción en la fosfoproteína, la BAA (α -N-Benzoil-L-Arginin-amida) y la BAE (α -N-Benzoil-L-Arginin-éster) que la bromelina del fruto. La enzima del vástago posee una clase sulfhidrilo, que es primordial para la biocatálisis.³⁵ Estas enzimas son superficialmente uniformes, se ha logrado identificar un promedio de 7 partes activas para la enzima del vástago y de dos a tres asignadas a la fruta.¹

Tabla 4. Distribución de la bromelina en la piña

Parte de la planta	Bromelina (100g de peso)	Actividad (upg)
Tallo		
Parte baja	0,25	138
Parte alta	0,16	1309
Tallo verde	0,14	51,44
Hojas	0,11	84,33
Fruto Verde		
Corona	0,14	235,6
Cáscaras	0,17	346,4
Pulpa	0,08	449,8
Fruto maduro		
Corona	0,04	137,3
Cáscaras	0,18	278,3
Pulpa	0,13	336,9

Fuente: ¹

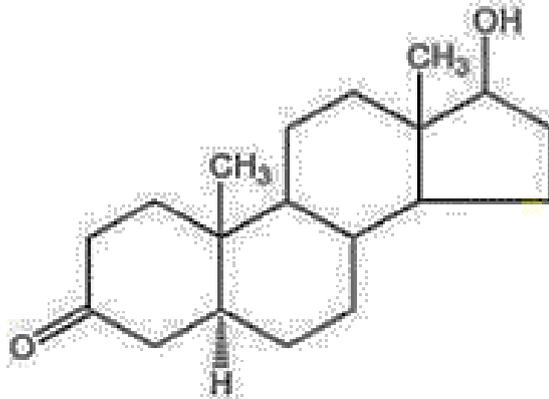
1.2 Bromelina

El químico venezolano Vicente Marcano identificó por primera vez en 1891 en la piña, un complejo proteolítico, considerado el componente activo más importante y ampliamente investigado de la fruta. La piña ha sido objeto de investigación a partir del año de 1884. La enzima proteolítica se compone de proteasas y mínimas cantidades de diferentes componentes. Una de ellas son las cisteíno-proteasas, que necesitan un grupo sulfhidrilo liberado para funcionar correctamente y son fundamentales en la regulación proteolítica del seno macromolecular en diversos procedimientos somáticos.³⁴

Por otro lado, esta enzima es uno de los productos con mayor producción global, debido a su acción destructora de enlaces de péptidos. Su acción es a fin a las proteínas de la

leche, la sangre y las que cumplen la función gelatinizante, además de ser catalizadoras que actúan sobre otras proteínas.³¹

Figura 4. Estructura de la enzima bromelina



Fuente:³¹

1.2.1 *Peso molecular, pH óptimo, temperatura óptima, estabilidad.* Esta enzima pertenece al grupo de las glicoproteínas simples cuyo peso de molécula es 24,5 kDa. Se la mantiene a una temperatura ideal de no mayor a 60 grados centígrados. Su contenido de aminoácido es de 212, incluyendo los tipos reductores, siete cisteínas. La bromelina que se encuentra en la zona del tallo tiene el nombre de bromelina de tallo, cuya estabilidad se mantiene cuando alcanza una temperatura de almacenamiento menor a 20 grados centígrados y con un pH desde 6 a 8,5.²⁴

1.2.2 *Propiedades químicas.* La bromelina está caracterizada por encontrarse en la piña y ser muy utilizada en varias industrias, se compone de enzimas como bromelaína, peroxidasa, fosfatasa ácida, catalasa, y más enzimas, como se muestra en la Tabla 5.³¹ Esta enzima se extrae de diversas partes de la piña (tallo y fruto) por diversas técnicas, su extracto presenta características acuosas, mismas de las bromeliaceae. Esta contiene inhibidores de proteinasas, que sometida a diversos procesos físicos se la puede transformar su estado de líquido a polvo sólido. Su actividad la conducen diversos sustratos, generando variedad aminoácidos en la digestión proteica.³⁶

Tabla 5. Composición química de la piña en su estado verde y madura

Componentes	Fruta verde	Fruta madura
Aminoácidos	%	%
Ác. Aspártico	29.8	29.8
Ác. Glutámico	23.2	23.4
Glicina	32.6	32.2
Alanina	23.8	24.4
Valina	19.8	20.1
Leucina	10	10
Isoleucina	16.4	16.2
Serina	32.2	32
Treonina	13.5	13.8
Cisteína	10	10
Metionina	6	5.8
Prolina	11.6	12
Fenilalanina	7.6	8
Tirosina	22.4	22.2
Lisina	7.8	8.3
Arginina	8.6	9.1
Amonio amida	43	43.4
Glucosamida	0.2	0.2
Carbohidrato	3.2	3.3

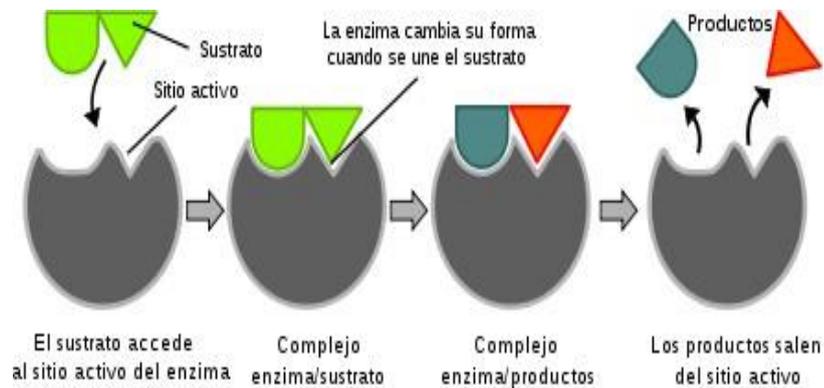
Fuente:³⁷

1.2.3 *Mecanismo de acción y especificidad.* Forman grupos dependiendo de los desechos de los aminoácidos, donde se encuentran a la papaína y a la bromelina. Se inhibe o inactiva por acción de los iones metálicos oxidantes y agentes reaccionantes con tioles. A diferencia de la extraída del fruto, que es de carácter ácido por su valor de pH que va desde los 3 hasta los 8 bromelina de los frutos cuya acción enzimática proteolítica no se regula en sitios con potencial hidrógeno que van desde los 3 y 8. ³⁸

El mecanismo de acción en la Figura 5, indica el accionar de la enzima bromelina frente a una proteína, donde inicia con la acción de unión entre el sustrato y la enzima, para formar un complejo enzima/ sustrato, posteriormente, la enzima cambia de forma, para finalmente formar complejos enzimas/productos que saldrán del sitio activo de la enzima. Contiene fuentes vitamínicas como los carotenoides, la vitamina B y el ácido

ascórbico, puesto que esta se logra activar al estar en contacto con la cisteína, tiosulfato y el glutatión. Esta enzima provoca una disolución de fibrina, debido a la capacidad hidrolizante que poseen las proteasas frente a las cadenas muropeptídicas, clasificadas en 4 familias proteasas: serina, aspártico, cisteína y metaos.³⁵

Figura 5. Mecanismo de acción de la bromelina



Fuente:³⁹

1.2.4 Hidrólisis de enlaces peptídicos. La bromelina es una combinación de enzimas que descomponen proteínas al romper los enlaces que unen los aminoácidos. Este proceso, conocido como hidrólisis, facilita la descomposición de las proteínas en péptidos más pequeños y aminoácidos libres. Las enzimas de la bromelina son selectivas y actúan sobre enlaces específicos dependiendo de la estructura del sustrato y la configuración de la zona activa de la enzima proteolítica. Siendo esta fundamental para diversas aplicaciones, como en tratamientos médicos para la limpieza de heridas y en la mejora de la digestión de proteínas en alimentos.⁷

1.2.5 Sitio activo y sustratos específicos. El sitio activo de la bromelina, como en muchas otras proteasas, lo forman una combinación de aminoácidos, principalmente serina, histidina y aspartato, esenciales para su funcionamiento. Esta estructura permite a la enzima atacar y romper las uniones covalentes de los prótidos. La especificidad en la bromelina identificadas en ciertos sustratos se debe a la forma y características del sitio activo y la naturaleza del sustrato mismo. La bromelina tiene una preferencia por ciertos aminoácidos en los sitios donde corta, lo cual determina cuán eficientemente puede descomponer las proteínas.⁴⁰

1.2.6 Aplicaciones en diversas áreas. Las proteasas se utilizan ahora ampliamente en la industria farmacéutica, del cuero, de la gestión de residuos industriales, de la cervecería y de la industria alimentaria, y proporcionan beneficios económicos.⁴¹

1.2.6.1 *Industria Alimentaria*. La bromelina se usa en la industria de los alimentos por sus propiedades proteolíticas, se usa para elaborar ablandadores de carnes por hidrolizar proteínas, mejorar la textura de productos y elaborar bebidas funcionales gracias a sus propiedades digestivas y antiinflamatorias.⁴²

1.2.6.2 *Medicina*. Esta enzima está formada por diversos tiol-endopeptidasas en donde sus características son principalmente atribuidas a su estructura, las mismas que han evidenciado funcionalidades óptimas para el sistema digestivo, destacando el control del peso, también en la parte bucal, anticancerígenas, entre otros.⁸

La bromelina, tiene un gran valor medicinal en padecimientos del tracto respiratorio, problemas en la piel, y para el tratamiento contra el cáncer, su efectividad frente a enfermedades relacionadas con el hígado sigue en aumento investigativo por su eficacia.⁴³

1.2.6.3 *Belleza*. En cosmética, tiene un efecto sobre el suavizado y blanqueamiento de la piel, así como sobre la eliminación de las pecas. La bromelina puede actuar sobre las células muertas del estrato córneo para degradarlos y separarlos.⁴⁴

1.2.6.4 *Biotecnología*. En el campo biotecnológico se considera que la bromelina obtenida de los residuos de la piña se considera potencia en agentes biológicos para desproteínizar los residuos de los carídeos. Generándose una aplicación tecnológica que reemplazaría las técnicas químicas comunes que por ende utilizan reactivos químicos. Siendo una innovadora técnica que impulsará nuevas alternativas aplicadas para los residuos de la piña, reduciendo costos e impacto ambiental.⁶

1.3 Extracción y purificación de proteínas

La creciente diversidad de aplicaciones de esta enzima ha generado un interés cada vez mayor en establecer un método efectivo para su extracción y purificación.¹¹

1.3.1 *Extracción*. Se busca que la purificación sea eficiente en términos de costos, rápida, con un alto rendimiento y confiable. También debe facilitar la recuperación constante del producto, ofreciendo una elevada capacidad.⁴⁵

El aislamiento de enzimas requiere tomar estrictas medidas de cuidado para evitar su desnaturalización, lo que resultaría en la pérdida de su actividad según lo indica (Primo, 2007). Inicialmente, se selecciona una fuente que puede ser microbiana, animal o vegetal, y que contenga la enzima deseada. Luego, el material biológico se degrada mediante su trituración (homogeneización) en un medio tamponado con un pH apropiado, permitiendo la desintegración de las células.

Las enzimas pueden encontrarse en forma soluble o asociadas a partículas celulares. En el caso de estas últimas, es necesario separarlas mediante centrifugación y posteriormente aislarlas. Por otro lado, las enzimas solubles pueden extraerse mediante métodos como la precipitación fraccionada con sulfato de amonio o solventes orgánicos, además de técnicas cromatográficas para su purificación. Esto permite obtener una fracción enzimática más pura y con mayor actividad.⁴⁶

Esta enzima es sensible a factores de estrés como la temperatura, la acidez que genera un límite en su actividad y su tiempo útil, lo que reduce los beneficios que ofrece dicha enzima.⁴⁷

1.3.2 *Efecto del pH.* Las proteínas suelen presentar múltiples grupos ionizables con diferentes valores de pK. En un pH característico, donde las cargas positivas y negativas de la proteína se equilibran completamente, se alcanza el punto conocido como isoelectrico. En esta condición, la molécula no posee carga neta y permanece estacionaria.⁴⁸

1.3.3 *Extracción con citrato de sodio.* El citrato de sodio es una sal derivada del ácido cítrico. Está compuesta por un anión citrato $C_6H_5O_7^{3-}$ y tres cationes de sodio Na^+ . Su fórmula molecular es $C_6H_5O_7Na_3$, mientras que su fórmula desarrollada se representa como $NaOOC-CH_2-C(COONa)(OH)-CH_2-COONa$. Este compuesto es la base conjugada del ácido cítrico, ya que se forma al reemplazar, de manera teórica, cada protón H^+ de los grupos carboxilo $-COOH$ del ácido cítrico por un átomo de sodio Na^+ .⁴⁹

1.3.4 *Purificación.* La precipitación de proteínas implica la incorporación de sales, solventes polares o no polares, así como las alteraciones de la temperatura y el pH. Cuando estos factores afectan una disolución de proteínas, la solubilidad de las mismas puede disminuir hasta el punto de causar su precipitación. La purificación tiene como fin, verificar la presencia de bromelina como el componente predominante en el extracto y elegir un preparado semipurificado para su posible aplicación. El creciente interés por las proteínas en diversas aplicaciones ha impulsado el desarrollo de nuevas técnicas para la obtención y purificación de estos compuestos, tanto en las frutas como en los subproductos generados durante su procesamiento.⁴⁸

1.4 Cuantificación de proteínas

Se establecen distintas técnicas para cuantificar los prótidos. Basados generalmente en: propiedades exclusivas de los prótidos para atraer la luz en el UV. También para formar nuevos sustitutos químicos o para unificar algunos colorantes.⁵⁰

La cuantificación de las proteínas es una herramienta importante para una amplia gama de aplicaciones biológicas. Los métodos a gran escala habituales incluyen los estudios de Lowry, el de ácido-bicinconínico (BCA), Biuret y Coomassie Bradford.⁵¹

1.4.1 *Método de Bradford para la cuantificación de prótidos.* Este método fue reseñado, tal y como lo dice su nombre, por Marion Mckinley Bradford, en 1976. Principalmente se debe resaltar como un procedimiento de espectrometría, que abarca una serie de procesos de laboratorio que hacen uso de radiaciones electromagnéticas mediante analitos, objetivo base que se requiere disociar.⁵²

Ese método permite medir la cantidad de proteínas solubilizadas en muestras, tales como lácteos, albúmina, tejidos vegetal o animal, u otros fluidos.⁵³ Es basado en el talento que poseen los prótidos para unificar algunos pigmentos que permitan su posterior lectura en el equipo.⁵⁴

1.4.1.1 *Principio del método.* Se cuantifican las uniones entre el colorante Azul Comaassie G-250 con la proteína, de tal forma que se compare con otras cantidades de proteínas BSA, su lectura se la realiza a través del uso de un equipo de absorbancia a un valor de 595 nm, obteniendo valores para comparar y analizar mediante gráficas como el valor de absorbido y el valor concentrado.⁵⁵

1.4.1.2 *Factores que afectan la formación del complejo.* Diversos factores pueden afectar a la formación del complejo proteico, los cuales van desde temperaturas altas, modificadores de pH; concentraciones alteradas; concentración de sal excesiva y movimiento. La reacción que mayor se manifiesta es la solubilidad de las proteínas que tiende a disminuir o a volverse insoluble, perdiendo su actividad biológica.

1.4.1.3 *Limitaciones de métodos tradicionales de cuantificación de proteínas.*

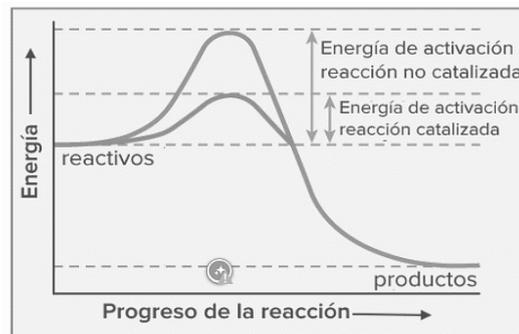
- La toxicidad de algunos métodos ampliamente utilizados.
- La representatividad de la muestra con múltiples ingredientes.
- Ausencia de disposiciones para la homogeneización de la muestra.
- Las interferencias no conocidas de algunos alimentos formulados.
- Dificultad para tener métodos que cuantifiquen solo proteína por los altos costos.⁵⁶

1.4.1.4 *Interferencias*. El método de Bradford es interferido al estar en presencia de otros reactivos que reaccionan con el colorante. El combinar múltiples reactivos altera el resultado de la prueba, siendo así que se debe preparar las muestra patrón con la solución tampón.⁵⁷

1.5 Determinación de actividad Enzimática

1.5.1 *Actividad enzimática*. Las enzimas actúan como catalizadores. Su papel principal es reducir la energía de activación requerida para que se lleve a cabo una reacción química como se observa en la Figura 6. Esto lo consiguen al unirse a un sustrato y mantenerlo en una posición que facilita que la reacción ocurra de manera más eficiente.⁵⁸

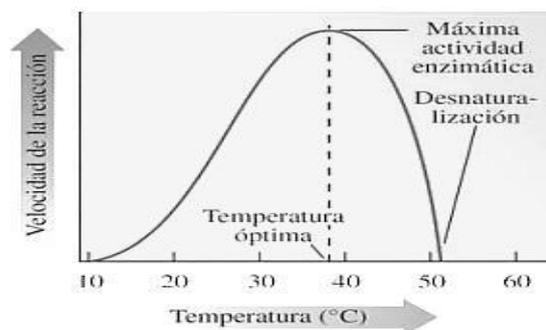
Figura 6. Actividad Enzimática



Fuente: ⁵⁸

1.5.2 *Factores que afectan la actividad enzimática*. La función de una enzima se refiere a la velocidad con la que facilita la transformación de un sustrato en un producto. Como se muestra en la Figura 7, dicha función está influenciada principalmente por las condiciones en las que ocurre la reacción, como la temperatura, el pH, la cantidad de enzima presente y la concentración del sustrato.⁵⁹

Figura 7. Factores que afectan la actividad enzimática



Fuente: ⁵⁹

Cuando la concentración del sustrato supera a la de la enzima, existe una relación proporcional entre la cantidad de enzima y su actividad. En numerosas reacciones enzimáticas, el sustrato está presente en cantidades mucho mayores que la enzima. Si la concentración de la enzima se mantiene fija, incrementar la cantidad de sustrato acelerará la velocidad de la reacción. Sin embargo, cuando el sustrato es abundante y satura todas las moléculas de la enzima, la velocidad de la reacción alcanza su punto máximo, y añadir más sustrato no producirá un aumento adicional en la velocidad.⁵⁹

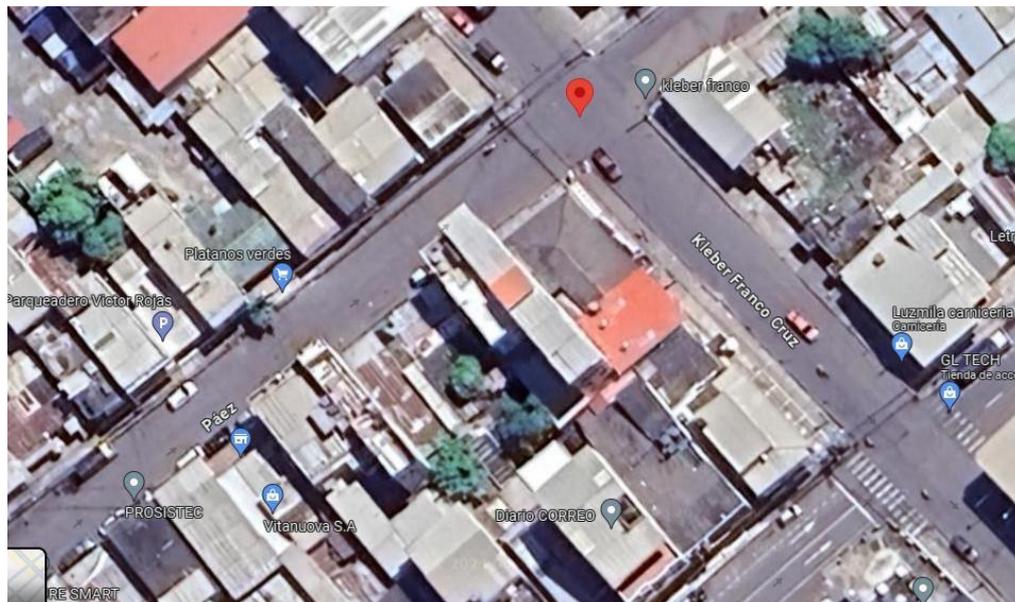
1.5.3 Liofilización. El proceso de liofilización trata de someter una muestra a congelamiento, para luego sublimarla y así remover el hielo formado, posterior se calienta la muestra con el aumento de temperatura a condiciones de vacío, para evitar su paso por su forma líquida y así eliminar su contenido de humedad.⁶⁰

2. METODOLOGÍA

2.1 Sujetos o unidades de análisis

Los sujetos de análisis para este trabajo de investigación son las muestras de la piña, obtenidas de las bodegas de abasto ubicadas en el centro de la ciudad de Machala, en la Figura 8 se detalla la ubicación geográfica de las bodegas de abasto (Av. Kleber Franco Cruz y Calle Páez).

Figura 8. Ubicación geográfica del lugar de materia prima



Fuente: Google Maps

2.1.1 *Población.* La población de este estudio consistió en la variedad Cayena Lisa, también conocida como Hawaiana. Esta selección busca representar las condiciones típicas de las piñas disponibles en esta zona central.

2.1.2 *Ubicación de la investigación.* La experimentación se llevó a cabo en el lugar de investigación de la Facultad de Ciencias Químicas y de la Salud de la Universidad Técnica de Machala.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 *Materiales, equipos y reactivos.* Los materiales, equipos y reactivos utilizados para el desarrollo del presente trabajo investigativo, se detalla a continuación en la Tabla 6.

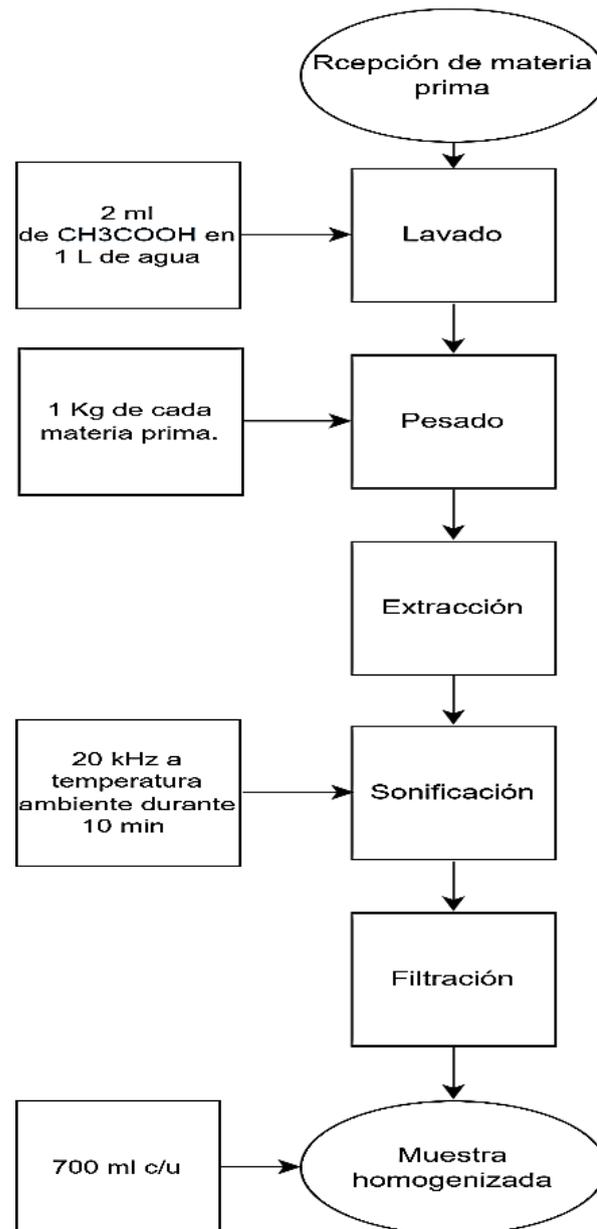
Tabla 6. Reactivos, equipos y materiales de laboratorio

Materiales laboratorio	de	Equipos	Reactivos
Mandil		Extractor industrial Oster	SBA (bovine serum albumin) a 0,1-2 mg/ml (p/v)
Mascarilla protectora, NK95		Balanza Analítica, Shimadzu Aux 200	Azul Comaassie Blue G-250 (p/p)
Vasos de precipitación (25, 50, 100, 250, 500 ml) Boeco		Agitador Orbital, INFORS	Sulfato de Amonio 1:1 (p/v), Fisher scientific
Espátula		HT CELLTRON	
Matraz Erlenmeyer (500 y 1000 ml) Pyrex		Ph-metro, OHAUS	Fosfato de Amonio 1:1 (p/v), Fisher Scientific
Tubos de ensayos de 10 ml		STARTER 5000	
Gradilla		Espectrofotómetro visible	UV Agua desionizada (p/v)
Embudos			Citrato de Sodio (p/v), Fisher chemical
Portaembudos			
Pera de succión, JP selecta			
Pipetas graduadas, Pyrex			
Micropipeta, Infitek			
Varillas de agitación, Fisher scientific			
Papel filtro			
Fuente: Elaboración propia			

2.2.2 *Pre tratamiento Físico.* Para poder obtener un mayor contenido de bromelina en la extracción, se realiza un pre tratamiento de la materia prima (cáscaras, corazón, tallo), sometiendo a un lavado y una desinfección. Se lava con abundante agua, y se cepilla detalladamente la fruta, posterior se añaden 2 ml de vinagre a 1000 ml de agua y se introduce la fruta durante un tiempo de 3 a 5 min para lograr una desinfección total, finalmente se enjuaga con abundante agua.⁶¹

Posterior a la desinfección de la materia prima se utiliza un extractor de jugo tipo industrial marca Oster para su extracción de líquidos de la materia prima, luego de la extracción de la muestra líquida se coloca las muestras en un ultrasonido por 10 min para eliminar impurezas y tener una muestra óptima, Figura 9.

Figura 9. Pre tratamiento de materia prima



Fuente: Elaboración propia

2.2.3 *Extracción.* Para la extracción de la bromelina se prepara una solución buffer de Citrato de Sodio, 12 g/L (p/v), y se mezcla con la dilución de la muestra, se debe corroborar que el pH se mantuviera en un rango de 7 - 8, lo cual permite que se precipite la muestra en regiones de iguales cargas que se rechazan sobre la proteína, lo cual genera la formación de la proteína. Se centrifuga la muestra a 120 rpm durante 10min para generar un mejor rendimiento en la generación de fases.

2.2.4 *Purificación.* Precipitada la muestra se añade a la fase acuosa Sulfato de amonio en proporción 1:1 (p/v), lo cual producirá una extracción directa, el control del pH es importante, pues debe estar en un valor 7 de neutralidad.

Para la retro extracción se mezclan la fase micelar resultante de la extracción directa con la micelar inversa obtenida de la fase acuosa fresca, se usa un buffer fosfato (NaH_2PO_4) a una concentración de 0.5 M, (p/v) en proporción 1:1, se agitan las fases durante un tiempo de 10 min a 400 rpm con la ayuda de una plancha de agitación y un agitador magnético manteniendo un pH a 7.

2.2.5 *Método de Bradford.* Para cuantificar bromelina por este medio se necesita de ejecutar con la mayor precisión posible una serie de pasos que permitan obtener un mejor resultado, tal y como se manifiesta en la Figura 10, del diagrama de flujo del método aplicado, los cuales se exponen a continuación:

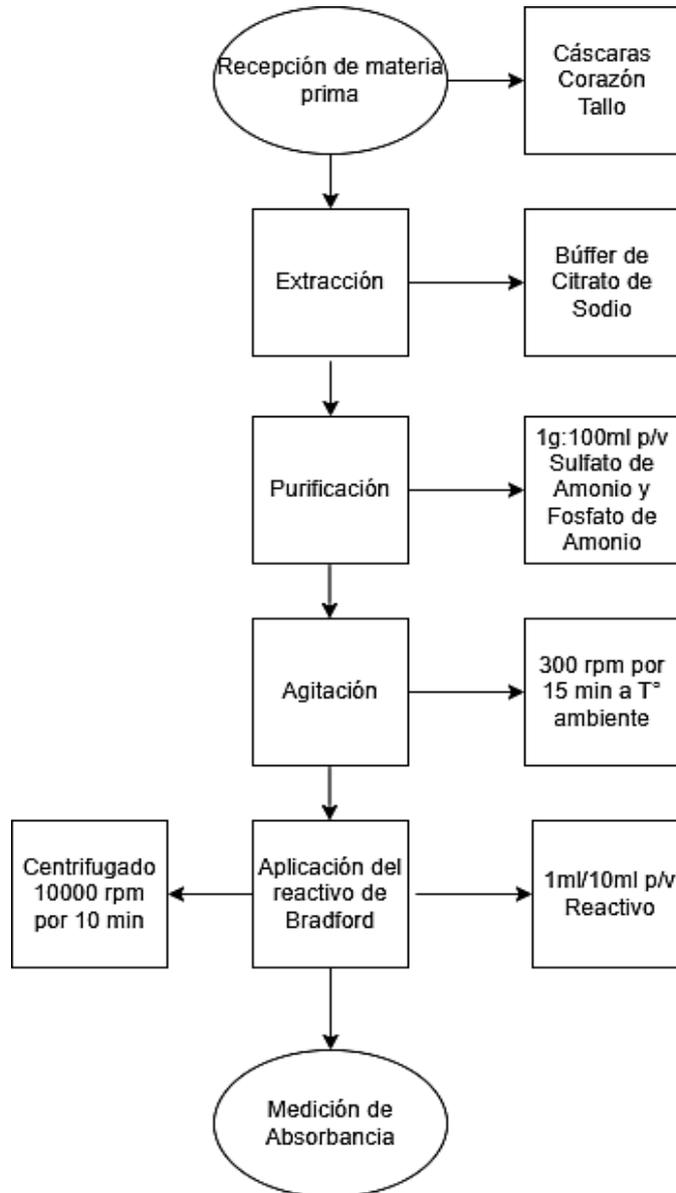
Se procede a preparar el reactivo de Bradford con 5 mg colorante Azul Comaassie Blue G-250 estabilizándolo con 2,5 ml etanol, 5 mg de H_3PO_4 y completando con 50 mililitros de H_2O .

Para la muestra patrón se toma la albúmina bovina, la cual se toman 20 mg de albúmina bovina y se la lleva a una disolución con 1000 mililitros de H_2O des ionizada o destilada, y poder tener una solución madre a 20ppm de concentración. Para lo cual se toma 1 mililitro de la disolución (muestra de cáscara, corona o tallo) y se lo vierte directamente a un tubo de ensayo con capacidad de 10 mililitros, y se agrega el reactivo de Bradford.

Posterior se añaden 1 mililitro de solución de Bradford, el mismo que se dejó reposar por 5 min a temperatura del aire que nos rodea, luego se ajustó el valor de la absorbancia en el equipo con la solución blanco reactivo. Medido el valor absorbido en el equipo con una longitud de onda de 290 nm, de las diferentes muestras de menor a mayor. Los valores resultantes se ajustaron a un método de regresión lineal.

Se realizaron 3 repeticiones por cada parte de la piña, en el método de Bradford para poder comparar los valores y obtener una mayor confiabilidad en los resultados.

Figura 10. Diagrama de flujo de extracción de bromelina por el método de Bradford

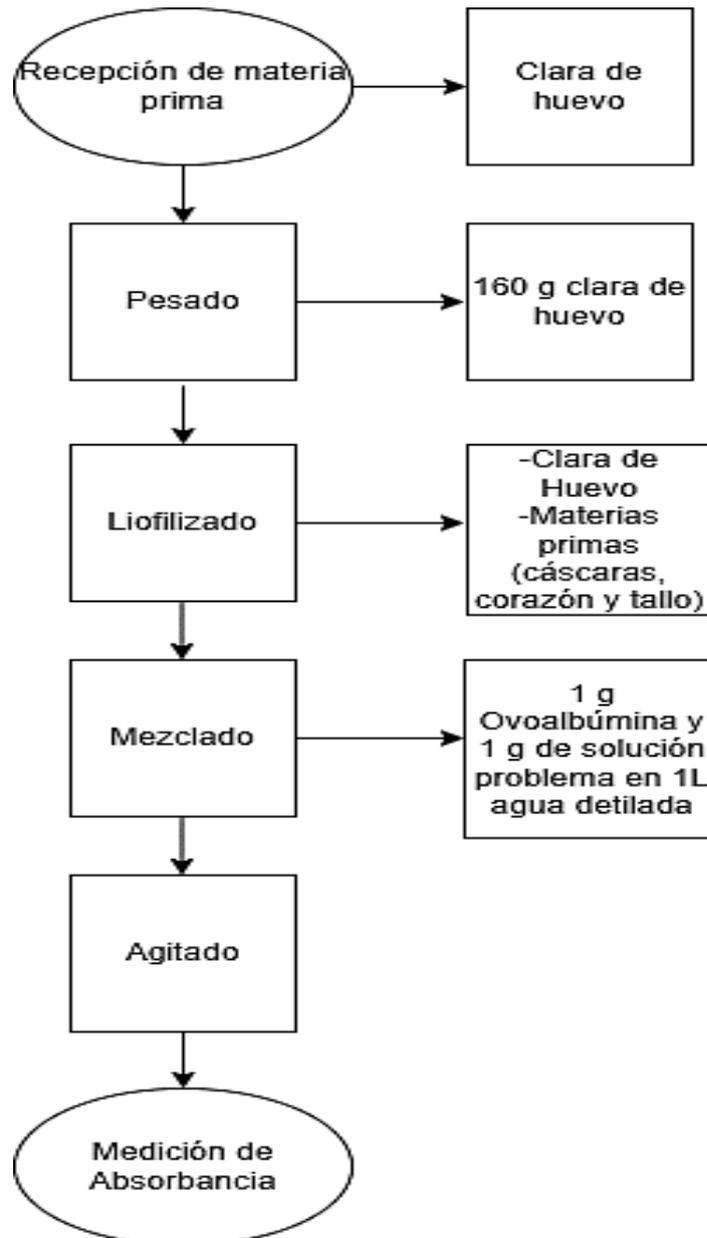


Fuente: Elaboración propia

2.2.5 Actividad Enzimática. Para medir la actividad enzimática de la bromelina extraída se utiliza albúmina de huevo o también conocida como ovoalbúmina, donde se utilizaron 5 huevos, de los cuales se obtuvo un peso de aproximadamente 160 g de clara de huevo, las cuales se somete a liofilización para eliminar el contenido de agua y obtener la proteína. Se realiza el mismo proceso de liofilización con las muestras (cáscaras, corazón, y tallo), una vez liofilizada la ovoalbúmina se toma 1g de muestra y se diluye en 10 ml de agua destilada y se agrega la muestra, se agita durante 10 min a 300 rpm a temperatura ambiente.

Finalmente se toman 1.5 ml de muestra con 1.5 ml de reactivo y se colocan en el espectrofotómetro de UV visible para medir su absorbancia, la misma que debe partir de un blanco el cual se debe basar en agua destilada con albúmina, y posterior a la medición del blanco se colocan las muestras de las materias primas utilizadas por triplicado para obtener una mayor confiabilidad en los resultados, a una absorbancia de 290 nm, Figura 11.

Figura 11. Actividad enzimática de la bromelina con ovoalbúmina



Fuente: Elaboración propia

2.4 Variables de Investigación

En esta sección se tomaron las siguientes variables dependientes e independientes.

2.4.1 Variables dependientes.

- Concentración de Bromelina cuantificada
- Método colorimétrico aplicado (Bradford)
- Actividad enzimática

2.4.2 Variables independientes.

- Materia prima utilizada (parte de la piña utilizada para la extracción)

2.5 Diseño experimental

El presente trabajo experimental aplicará un diseño con 2 variables, tales como: Cantidad de Bromelina, y la actividad enzimática, en cada una de las partes de la piña, con 3 repeticiones, cuyos niveles correspondientes se detallan en la siguiente Tabla 7.

Tabla 7. Diseño factorial – Muestras

Muestras	Partes	N° de repeticiones	Descripción
M1	Cáscaras	3	Cantidad de Bromelina extraída
M2	Cáscaras		Actividad enzimática
M3	Corazón	3	Cantidad de Bromelina extraída
M4	Corazón		Actividad enzimática
M5	Tallo	3	Cantidad de Bromelina extraída
M6	Tallo		Actividad enzimática

Fuente: Elaboración propia

2.6 Análisis de datos

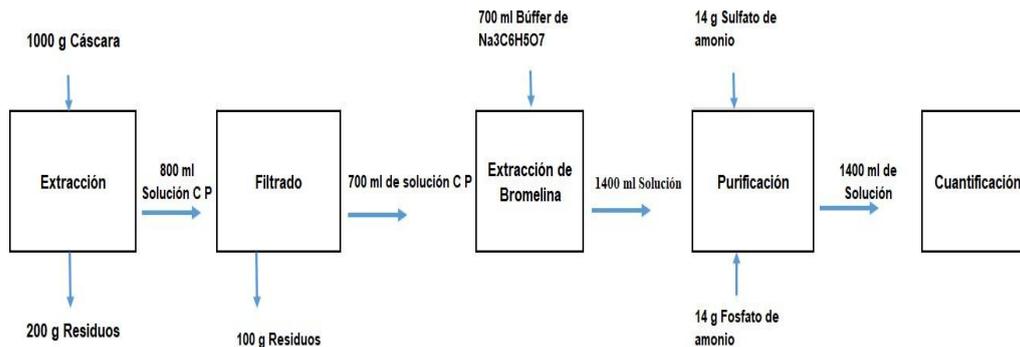
Las muestras del proceso de cuantificación de bromelina (partes de la piña) fueron analizadas en el equipo espectrofotómetro de UV visible, el cual mide la absorbancia UV a una longitud de onda de 290 nm, utilizando 3 ml de la muestra con reactivo. Para medir la actividad enzimática se utilizó un 1,5 mg de ABS (Albúmina Sérica Bovina), con 1,5 ml del reactivo de Bradford. Para medir la capacidad de desnaturadora de la enzima frente a una proteína, se utilizó proteína animal (Albúmina de huevo) con las muestras obtenidas de cada parte de la piña, a una absorbancia de 290 nm. Los datos resultantes recolectados serán analizados mediante el programa Origin, además de este software, se incluirán análisis realizados en SPSS STATISTIC, y Excel.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Tratamientos Físicoquímicos para la extracción de Bromelina

Por balance de materia se obtiene la masa de la bromelina presente en las muestras utilizadas, tal como se muestra en la Figura 12.

Figura 12. Balance de masa de la piña



Fuente: Elaboración propia

Se obtuvieron los siguientes datos:

Materia prima:

M1 (Cáscara)= 1kg

M2 (Corazón)= 1kg

M3 (Tallo)= 1kg

Después de la extracción se contabilizan las salidas de jugo y los residuos sólidos, para esto se realiza un balance de masa de cada materia prima:

Ecuación 1:

$$A = B + C \quad (1)$$

A = Alimento

B = Residuo

C = Producto

Al conocer el valor de la alimentación y el valor del producto, se despeja la incógnita de B para obtener el valor del residuo:

Ecuación 2:

$$B = A - C \quad (2)$$

$$B = 1000g - 800g$$

B = 200g por cada materia prima utilizada (Residuo)

Las cantidades obtenidas de las materias primas se utilizan para la siguiente fase como alimento, es decir el producto resultante de una fase se convierte en la alimentación de la siguiente fase de filtración, quedando:

Ecuación 3:

$$B = A - C \quad (3)$$

Donde:

A= Alimentación (producto obtenido de la extracción)

B= Producto

C= Residuo (Filtrado)

$$B = 800g - 100g$$

$B = 700g$ de cada materia prima, posterior al filtrado.

Para calcular la cantidad de bromelina presente en cada muestra, se debe utilizar el valor obtenido de la concentración de bromelina en cada una de las materias primas:

$$\text{Cáscara} = 1,785 \text{ mg/L}$$

$$\text{Corazón} = 1,6357 \text{ mg/L}$$

$$\text{Tallo} = 2,0373 \text{ mg/L}$$

Estos valores indican que, en cada litro de muestra, existe una cantidad en mg de bromelina, para conocer la masa presente de bromelina, es necesario hacer una relación entre los mg de la bromelina en cada litro de muestra con la masa o volumen de la materia prima:

$$1,785 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \rightarrow 1\text{L}$$

$$x \rightarrow 1,4 \text{ L}$$

$$x = \frac{1,785 \frac{\text{mg}}{\text{L}} * 1,40\text{L}}{1\text{L}}$$

$X = 2.499 \text{ mg}$ de Bromelina en cáscara

De igual manera se realiza una relación (regla de tres) entre los valores de la bromelina obtenida en unidades de miligramos del corazón por cada litro de materia prima obtenida.

$$1,6357 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \rightarrow 1\text{L}$$

$$x \rightarrow 1,4 \text{ L}$$

$$x = \frac{1,6357 \frac{\text{mg}}{\text{L}} * 1,4 \text{ L}}{1\text{L}}$$

$X = 2,2899 \text{ mg}$ de Bromelina en corazón

Relación de bromelina obtenida del tallo por el volumen obtenido de materia prima de tallo.

$$2,0373 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \rightarrow 1\text{L}$$

$$x \rightarrow 1,4 L$$

$$x = \frac{2,0373 \frac{mg}{L} * 1,4 L}{1L}$$

$X = 2,8522 \text{ mg de Bromelina en tallo}$

Los tratamientos previos realizados a la materia prima, cumplen con una función incondicional, la cual es poder obtener un mayor rendimiento o un mejor resultado esperado. Para lo cual es necesario obtener los valores de la absorbancia de cada una de las muestras en las diferentes partes de la piña, cuyos datos sirven para el cálculo de la concentración de la enzima bromelina, los mismos que se encuentran expresados en unidades nanómetros (nm) leídos en un espectrofotómetro de UV visible, con un haz de luz de 290 nm, cada muestra se analizó por triplicado como se muestra en las Tablas 8, 9 y 10.

Tabla 8. Valores de Absorbancia en muestra de Cáscaras de piña

Repeticiones	Absorbancia	Unidad
M1	2,376	Nm
M2	2,184	Nm
M3	2,424	Nm

Fuente: Elaboración propia

Tabla 9. Valores de Absorbancia en muestra de Corazón de piña

Repeticiones	Absorbancia	Unidad
M1	2,219	Nm
M2	2,086	Nm
M3	2,095	Nm

Fuente: Elaboración propia

Tabla 10. Valores de Absorbancia en muestra de Tallo de piña

Repeticiones	Absorbancia	Unidad
M1	2,698	Nm
M2	2,662	Nm
M3	2,611	Nm

Fuente: Elaboración propia

Obtenido el valor de las absorbancias de cada materia prima, se puede calcular la concentración mediante la aplicación de la ecuación de la recta, obtenida de la curva de calibración de la albúmina sérica bovina, a un haz de luz de 290 nm, los valores se expresan en unidades de absorbancia (nm) en la Tabla 11.

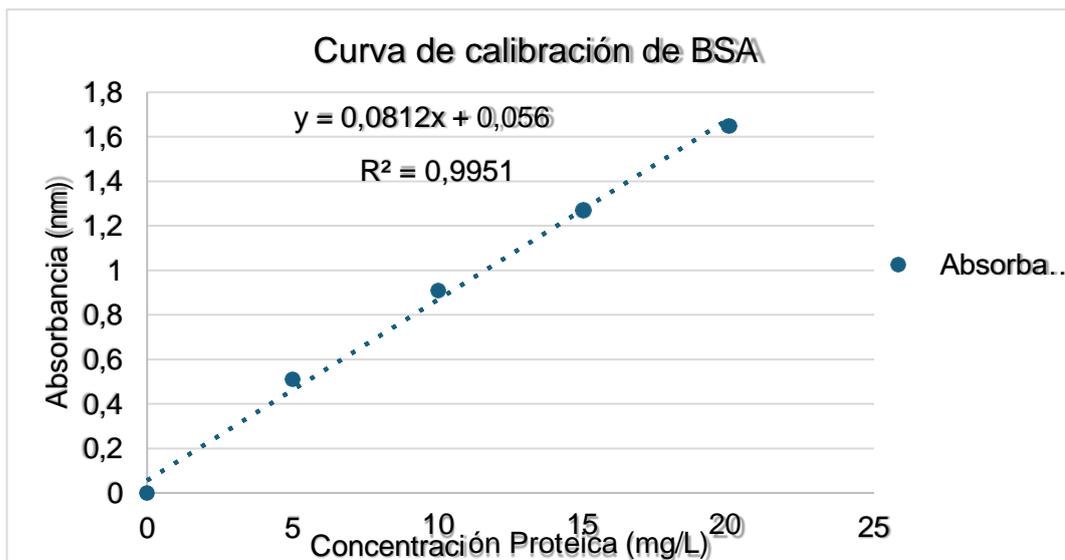
Tabla 11. Curva de calibración de Albúmina Sérica Bovina (BSA)

Concentración (ppm)	Absorbancia (nm)
0	0
5	0,51
10	0,91
15	1,27
20	1,65

Fuente: Elaboración propia

Con los datos de la absorbancia de la albúmina bovina se genera una curva de calibración, para poder obtener la ecuación de la recta, la cual se utiliza para determinar la concentración de la bromelina en cada muestra, y su coeficiente de regresión lineal (R^2), el cuál es cercano a la unidad tal y como se tiene en la Figura 13.

Figura 13. Curva de Calibración de Albúmina Sérica Bovina (BSA)



Fuente: Elaboración propia

La muestra problema consiste en un extracto diluido con reactivo de Bradford, incubar por 5 min a temperatura ambiente, obteniendo los datos revisados en la Tabla 11.

Obtenida la curva se utiliza la ecuación de la recta donde se expresa la siguiente ecuación 4:

$$y = 0.0812x + 0.056 \quad (4)$$

Donde:

$X = \text{Concentración}$

$Y = \text{Absorbancia}$

Por lo cual se despeja x de la ecuación 4, quedando así:

$$x = (y * 0.0812) / 0.056$$

$$x = (2.376 * 0.0812) / 0.056$$

$$x = 1,8218 \text{ ppm (mg/L)}$$

Tabla 12. Media y desviación de la bromelina en cada tipo de sustrato

Sustratos	C.Bromelina	Media	N	Desv.
Cáscaras	1,785000	1,7850	3	,0973636
Corazón	1,635700	1,6357	3	,0570024
Tallo	2,037267	2,037267	3	,0335148
Total	1,819322	1,819322	9	,1853676

Fuente: Elaboración propia

Se observa que la mayor eficiencia de extracción se obtuvo en el tallo (3.80%), seguido de la cáscara (3.33%), y finalmente el corazón (3.05%). Estas diferencias pueden explicarse por la mayor concentración de bromelina en el tallo, ya que esta parte de la piña es conocida por contener la mayor cantidad de la enzima.

La menor variabilidad en el tallo (DE = 0.05) sugiere que la extracción de bromelina en esta fracción es más consistente en comparación con la cáscara y el corazón. Es necesario realizar un análisis de varianza (ANOVA One Way) para determinar si las diferencias entre los grupos son estadísticamente significativas.

3.2 Concentración de Bromelina

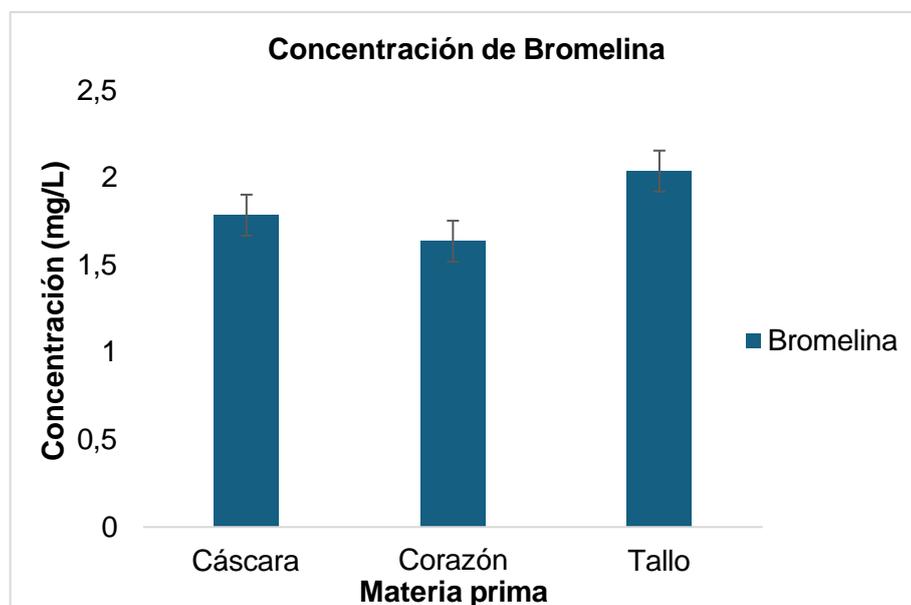
Para determinar si existían diferencias significativas en la concentración de bromelina entre los tres sustratos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA One-Way) utilizando el software SPSS, y los valores obtenidos en la Tabla 13 y Figura 14

Tabla 13. Concentración de Bromelina en cada sustrato

Concentración de Bromelina en ppm		
Cáscara	Corazón	Tallo
1,8218	1,7014	2,0687
1,6746	1,5994	2,0411
1,8586	1,6063	2,0020

Fuente: Elaboración propia

Figura 14. Concentración de bromelina (mg/ml)



Fuente: Elaboración propia

Los resultados del ANOVA mostraron que hubo diferencias significativas entre los grupos, con un valor de $F = 26.767$ y un p -valor = 0.001, lo que indica que al menos uno de los sustratos presentó una concentración de bromelina significativamente diferente a los otros expuestos en la Tabla 14.

Tabla 14. Anova One Way de Concentración de Bromelina

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,247	2	,124	26,767	,001
Dentro de grupos	,028	6	,005		
Total	,275	8			

Fuente: Elaboración propia

Para analizar en detalle qué pares de sustratos mostraron diferencias significativas, se aplicó la prueba de Tukey (Tabla 15). Los resultados indicaron que la cáscara y el tallo presentaron una diferencia de medias significativa ($p = 0,009$), con una diferencia de $-0,252266$ ppm entre ambos, siendo el tallo significativamente más concentrado en bromelina. Además, el corazón y el tallo también mostraron una diferencia significativa ($p = 0,001$) de $0,4015667$ ppm, con el tallo mostrando una mayor concentración. La cáscara y el corazón, aunque con una diferencia de medias de $0,14930$ ppm, no presentó una diferencia significativa ($p = 0,080$).

Tabla 15. Índice de cristalinidad de películas

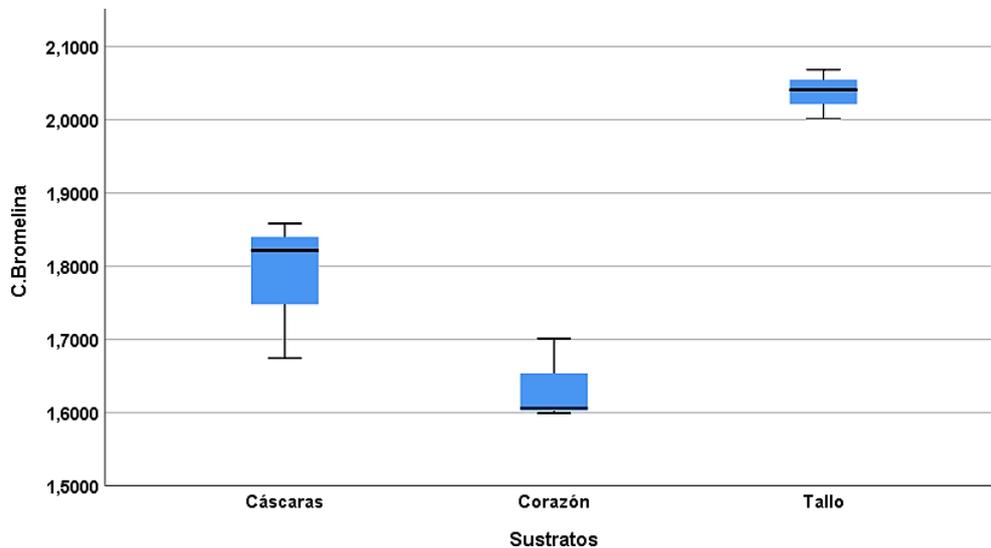
Prueba de Tukey						
Variable dependiente: C.Bromelina						
(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
Sustratos	Sustratos				Límite inferior	Límite superior
Cáscaras	Corazón	,1493000	,0554821	,080	-,020934	,319534
	Tallo	-,2522667*	,0554821	,009	-,422501	-,082032
Corazón	Cáscaras	-,1493000	,0554821	,080	-,319534	,020934
	Tallo	-,4015667*	,0554821	,001	-,571801	-,231332
Tallo	Cáscaras	,2522667*	,0554821	,009	,082032	,422501
	Corazón	,4015667*	,0554821	,001	,231332	,571801

La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Fuente: Elaboración propia

Los resultados sugieren que el tallo presenta la mayor concentración de bromelina, seguida de la cáscara, y finalmente el corazón. Estas diferencias significativas podrían estar relacionadas con las características propias de cada parte de la piña, como la distribución de bromelina y otros factores biológicos.

Figura 15. Diagrama de Cajas y Bigotes de Concentración de Bromelina vs Sustratos



Fuente: Elaboración propia

En el diagrama de cajas (Figura 15), muestra la distribución de los niveles de bromelina en diferentes sustratos (cáscara, corazón y tallo).

El diagrama de cajas muestra la mediana, el rango intercuartil (IQR), y los valores atípicos (si los hubiera) de los datos de bromelina para cada uno de los sustratos.

La línea dentro de cada caja indica la mediana de los niveles de bromelina para cada sustrato.

Esto indica que, en promedio, el tallo tiene los niveles más altos de bromelina, seguido por la cáscara, y finalmente el corazón.

IQR, que se representa por la caja, muestra la dispersión de los datos. Cuanto más grande sea la caja, mayor es la variabilidad de los valores dentro de esa categoría.

La cáscara tiene un IQR más estrecho, lo que sugiere que sus niveles de bromelina son más consistentes.

El corazón y el tallo muestran IQR más amplios, lo que indica más variabilidad en los valores medidos.

Los puntos fuera de las líneas horizontales (bigotes) indican posibles valores atípicos. En este gráfico no parecen haber valores extremos o atípicos significativos.

El tallo tiene los niveles más altos de bromelina, seguido de la cáscara, y el corazón presenta los valores más bajos y consistentes.

3.3 Actividad Enzimática

Los resultados de la actividad enzimática se evidencian en la Figura 16, donde se observa la actividad enzimática de la cáscara, la cual muestra un aumento notable durante los 15 min iniciales, llegando a su punto máximo de hidrólisis de la proteína utilizada en los 15 min posteriores (30 min) con un valor de 0,1979 ppm (mg/L). Luego, de llegar a este punto máximo de hidrólisis se denota una disminución mínima, pero aun obteniendo valores altos hasta los 30 min posteriores (60 min).

A diferencia de la cáscara, los valores obtenidos de la bromelina obtenida del corazón tienen una actividad enzimática menor a la de la cáscara, llegando a su máxima capacidad de hidrólisis de proteína, cerca del min 30 con un valor de concentración de aproximado 0,1838 ppm (mg/L) y para finalmente decaer su actividad al minuto 60.

El tallo a diferencia de la cáscara, y el corazón presenta una actividad enzimática menor, puesto que su hidrólisis de proteínas forma una curva poco pronunciada, es decir la capacidad de hidrolizar proteínas es baja, se mantiene relativamente estable después de los 3 minutos, sin presentar una caída tan marcada, y su actividad comienza a decaer rápidamente posterior a los primeros 15 min transcurridos (0,1489 mg/L).

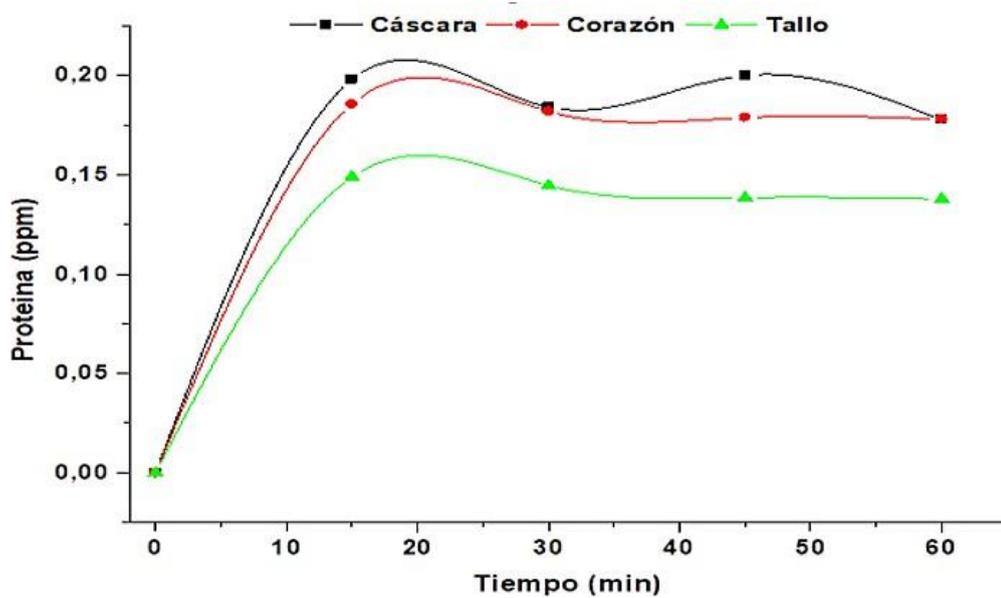
3.4 Cinética de la reacción enzimática

El aumento acelerado en el intervalo de 0 a 15 min manifiesta una hidrólisis de la albúmina de forma rápida, probablemente se trate de ciertas condiciones como el pH, y la temperatura que permiten que este tipo de enzimas contengan una gran cantidad de sustrato para efectuar la reacción.

El valor máximo se encuentra en el intervalo de 15 a 30 min, el cual se evidencia la degradación de la albúmina, para posterior alcanzar un punto de saturación que permiten medirlas en el ensayo, después de este punto, entre los 30 y 60 minutos, se nota una disminución en la actividad en la cáscara y el corazón, lo cual podría explicarse por varios motivos:

1. Una inactivación parcial de la enzima, ya sea por desnaturalización debido a las condiciones del medio o por autólisis.
2. Una reducción en la concentración de albúmina disponible, lo que disminuye la velocidad de la reacción.
3. La formación de productos de reacción que podrían inhibir o alterar la actividad de la enzima.

Figura 16. Actividad enzimática de la bromelina



Fuente: Elaboración Propia

En el tallo se observa que la actividad enzimática se mantiene bastante constante, lo que podría indicar que la enzima se desactiva de forma menos pronunciada o que, desde el inicio, su actividad es más baja. Esto explica que la disminución en su actividad no sea tan notable como en las otras partes.

Se realizó un Anova de una vía para el análisis de los datos obtenidos de la actividad enzimática de cada una de las partes estudiadas de la piña como se manifiesta en la Tabla 16, donde se representa a cada tipo de sustrato con una letra diferente.

Tabla 16. Anova one way de la actividad enzimática de la bromelina

One-Way ANOVA on col(A) -> col(C):			
Data	Mean	Variance	N
A	0,287	1,30E-05	3
B	0,269	7,60E-05	3
C	0,21567	4,33E-06	3

F = 132,7
p = 1,0805E-5
At the 0,05 level, the means are significantly different.

Fuente: Elaboración propia

El valor de F es 132.7, lo que indica que la variabilidad entre las medias de los grupos es mucho mayor que la variabilidad dentro de los grupos. Esto sugiere que hay diferencias significativas entre las medias de los grupos.

El valor p es 1.0805E-5, que es mucho menor que el nivel de significancia de 0.05. Esto significa el rechazo de la hipótesis nula. Dado que el valor p es menor que 0.05, concluimos que hay diferencias significativas entre las medias de los tres grupos (cáscara, corazón y tallo) al nivel de significancia del 5%.

La cáscara (A) tiene la media más alta (0.287), lo que sugiere que esta parte de la piña tiene un valor más alto en la variable medida en comparación con las otras partes.

El corazón (B) tiene una media intermedia (0.269), lo que indica que esta parte tiene un valor intermedio en la variable medida.

El tallo (C) tiene la media más baja (0.21567), lo que sugiere que esta parte de la piña tiene el valor más bajo en la variable medida.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten concluir que el tallo de la piña presenta la mayor concentración de bromelina (2.0373 mg/L), seguido de las cáscaras (1.7850 mg/L) y el corazón (1.6357 mg/L). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas, como lo demuestra el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey, que confirmaron que el tallo es la fuente más eficiente para la extracción de bromelina.

En cuanto a la actividad enzimática, se observó que la cáscara mostró la mayor capacidad de hidrólisis de proteínas, alcanzando su punto máximo a los 30 minutos (0.1979 ppm), seguida del corazón (0.1838 ppm) y el tallo (0.1489 ppm). Sin embargo, la actividad enzimática del tallo fue más estable a lo largo del tiempo, lo que sugiere que, aunque su capacidad de hidrólisis inicial es menor, su estabilidad podría ser ventajosa en aplicaciones industriales donde se requiera una actividad enzimática prolongada.

El método de Bradford demostró ser una técnica eficaz para la cuantificación de bromelina, aunque se observó que la presencia de interferentes y las condiciones experimentales pueden afectar la precisión de los resultados. La optimización del proceso de extracción, incluyendo el pretratamiento físico-químico de las muestras, fue clave para maximizar el rendimiento de la enzima.

Esta investigación aporta datos valiosos para la industria, ya que no solo identifica al tallo como la fuente más rica en bromelina, sino que también sugiere que las cáscaras y el corazón pueden ser aprovechados como subproductos para la extracción de esta enzima, contribuyendo así a la valorización de residuos agrícolas y a la reducción del impacto ambiental.

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar estudios adicionales para optimizar los parámetros de extracción, como el pH, la temperatura y el tiempo de centrifugación, con el fin de maximizar el rendimiento de bromelina y mejorar la eficiencia del proceso. Además, se sugiere explorar métodos de purificación más avanzados, como la cromatografía, para obtener una enzima de mayor pureza.
2. Dado que la actividad enzimática de la bromelina varía según la fuente de extracción, se recomienda realizar estudios de estabilidad a largo plazo para determinar cómo afectan factores como el almacenamiento, la temperatura y el pH a la actividad de la enzima. Esto permitiría identificar las condiciones óptimas para su conservación y aplicación industrial.
3. Validar los resultados obtenidos con el método de Bradford mediante técnicas analíticas más avanzadas, como la HPLC o la espectrometría de masas. Esto permitiría confirmar la precisión de los datos y reducir posibles errores asociados a interferencias en la matriz.
4. Las varianzas dentro de cada grupo son relativamente bajas, lo que indica que los datos dentro de cada grupo son bastante consistentes. Cada grupo tiene solo 3 observaciones, lo que puede limitar la generalización de los resultados. Sería recomendable aumentar el tamaño de la muestra para obtener resultados más robustos.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Lago, I. L.; Varela, J. D.; de Caceres, F. M. LA BROMELINA: UNA PROTEASA DE INTERÉS COMERCIAL. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* **1996**, 1 (2), 17–22. <https://doi.org/10.1080/11358129609487552>.
- (2) Bansod, S. P.; Parikh, J. K.; Sarangi, P. K. Pineapple Peel Waste Valorization for Extraction of Bio-Active Compounds and Protein: Microwave Assisted Method and Box Behnken Design Optimization. *Environ Res* **2023**, 221, 115237. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115237>.
- (3) Mohd Ali, M.; Hashim, N.; Abd Aziz, S.; Lasekan, O. Quality Prediction of Different Pineapple (*Ananas Comosus*) Varieties during Storage Using Infrared Thermal Imaging Technique. *Food Control* **2022**, 138, 108988. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108988>.
- (4) Usmani, Z.; Sharma, M.; Awasthi, A. K.; Sharma, G. D.; Cysneiros, D.; Nayak, S. C.; Thakur, V. K.; Naidu, R.; Pandey, A.; Gupta, V. K. Minimizing Hazardous Impact of Food Waste in a Circular Economy – Advances in Resource Recovery through Green Strategies. *J Hazard Mater* **2021**, 416, 126154. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126154>.
- (5) Jenny Gustavsson Christel Cederberg Ulf Sonesson, por. *ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA*; 2012.
- (6) Alpízar Cordero, J. R.; Villegas Peñaranda, L. R.; Madrigal Carballo, S.; Sibaja Ballester, M. Utilización De La Biomasa Residual Del Cultivo De La Piña (*Ananas Comosus*) Para La Desproteínización Enzimática De Desechos De La Actividad Camaronera . *Uniciencia* **2013**, 3 (1), 1–15.
- (7) Naeem, M.; Manzoor, S.; Abid, M.-U.-H.; Tareen, M. B. K.; Asad, M.; Mushtaq, S.; Ehsan, N.; Amna, D.; Xu, B.; Hazafa, A. Fungal Proteases as Emerging Biocatalysts to Meet the Current Challenges and Recent Developments in Biomedical Therapies: An Updated Review. *Journal of Fungi* **2022**, 8 (2), 109. <https://doi.org/10.3390/jof8020109>.
- (8) González Taracena, M.; Valencia Ruiz, K. I.; Martínez Báez, A. Z.; Márquez Zamora, L.; Ramírez López, E. Aplicaciones Terapéuticas de La Bromelina En El Sistema Gastrointestinal En Humanos: Una Revisión de Alcance. *RESPYN Revista Salud Pública y Nutrición* **2022**, 21 (2), 39–49. <https://doi.org/10.29105/respyn21.2-5>.

- (9) Bradford, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* **1976**, *72* (1–2), 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.
- (10) Langyan, S.; Bhardwaj, R.; Radhamani, J.; Yadav, R.; Gautam, R. K.; Kalia, S.; Kumar, A. A Quick Analysis Method for Protein Quantification in Oilseed Crops: A Comparison With Standard Protocol. *Front Nutr* **2022**, *9*. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.892695>.
- (11) Costa, H. B.; Fernandes, P. M. B.; Romão, W.; Ventura, J. A. A New Procedure Based on Column Chromatography to Purify Bromelain by Ion Exchange plus Gel Filtration Chromatographies. *Ind Crops Prod* **2014**, *59*, 163–168. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.04.042>.
- (12) Bansod, S. P.; Parikh, J. K.; Sarangi, P. K. Pineapple Peel Waste Valorization for Extraction of Bio-Active Compounds and Protein: Microwave Assisted Method and Box Behnken Design Optimization. *Environ Res* **2023**, *221*, 115237. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115237>.
- (13) Usmani, Z.; Sharma, M.; Awasthi, A. K.; Sharma, G. D.; Cysneiros, D.; Nayak, S. C.; Thakur, V. K.; Naidu, R.; Pandey, A.; Gupta, V. K. Minimizing Hazardous Impact of Food Waste in a Circular Economy – Advances in Resource Recovery through Green Strategies. *J Hazard Mater* **2021**, *416*, 126154. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126154>.
- (14) Mohd Ali, M.; Hashim, N.; Abd Aziz, S.; Lasekan, O. Pineapple (*Ananas Comosus*): A Comprehensive Review of Nutritional Values, Volatile Compounds, Health Benefits, and Potential Food Products. *Food Research International* **2020**, *137*, 109675. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109675>.
- (15) Vargas Serna, C. L.; Gonzalez Torres, V.; Ochoa Martinez, C. I.; Velez Pasos, C. Conservación de Piña Mínimamente Procesada: Evaluación de Parámetros Fisicoquímicos. *Ingeniería* **2022**, *27* (1), e17564. <https://doi.org/10.14483/23448393.17564>.
- (16) Muñoz Murillo, J. P.; Zambrano Vélez, M. I.; Párraga Álava, R. C.; Verduga López, C. D. Uso de Papaína y Bromelina y Su Efecto En Las Características Organolépticas y Bromatológicas de Chuletas de Cerdo Ahumadas. *Revista Electronica Cooperación - Universidad - Sociedad* **2019**, *4* (2), 2–3.
- (17) Ramírez Carreto, S.; Miranda Zaragoza, B.; Rodríguez Almazán, C. Purificación de Proteínas. *Mensaje Bioquímico* **2021**, *45*, 3–4.

- (18) Mohd Ali, M.; Hashim, N.; Abd Aziz, S.; Lasekan, O. Pineapple (*Ananas Comosus*): A Comprehensive Review of Nutritional Values, Volatile Compounds, Health Benefits, and Potential Food Products. *Food Research International* **2020**, *137*, 109675. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2020.109675>.
- (19) Uresti Gil, J.; Vélez-Izquierdo, A.; Espinosa-García, J. A.; Jolalpa-Barrera, J. L.; Rangel-Quintos, J.; Uresti-Duran, D. Estudio Técnico-Económico Para Identificar Áreas Con Potencial Para Producir Piña En El Trópico Húmedo de México. *Rev Mex De Cienc Agric* **2020**, *11* (7), 1619–1632. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i7.2594>.
- (20) Agudelo, M.; Alfonso, J. EVALUACIÓN DE LA OBTENCIÓN DE BROMELINA POR LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN: BIFASES ACUOSAS Y SALTING OUT CONTENIDA EN LOS CORAZONES DE LAS TRES VARIETADES DE PIÑA PROCESA, FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA, Bogotá, 2019.
- (21) Kumar Jha, A.; Assumi, S.; Singh, P.; Jha, A. *ICAR-Directorate of Knowledge Management in Agriculture*; 2021. <https://www.researchgate.net/publication/351450967>.
- (22) Pinto, M. *EL CULTIVO DE LA PIÑA Y EL CLIMA EN EL ECUADOR*; Quito, 2012.
- (23) Morales, L.; Sinchigalo, R.; Córdova, A.; Bedoya, M. Producción de Frutas Tropicales En Ecuador: Especialización Productiva y Función de Optimización. *CIENCIA UNEMI* **2024**, *17*(44), 177–193. <https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol17iss44.2024pp177-193p>.
- (24) Magallanes, J. R.; Salcedo, N. M. Extracción, Caracterización y Secado Por Aspersión de Bromelina Cruda Obtenida a Partir de Residuos de Piña “Perolera” (*Anana Comosus*), Escuela Superior Politécnica Del Litoral, Guayaquil, 2012.
- (25) Chinchay Huamán, L. F.; Guzmán Farfán, L. C.; Robles Cueva, H.; Llanos Cabanillas, L. A.; Arbulú Zuazo, A. A. Estudio de Adaptación Del Cultivo de Piña (*Ananas Comosus* L.) Variedad MD 2 Cv. Golden Bajo Tres Dosis de Fertilización y Tres Densidades de Siembra Con Riego Por Goteo En Suelos Arenosos de Piura. *REVISTA DE INNOVACIÓN Y TRANSFERENCIA PRODUCTIVA* **2022**, *3* (1), e002. <https://doi.org/10.54353/ritp.v3i1.e002>.
- (26) Torres Ruiz, J. R.; Lecona Guzmán, C. A.; Silverio Gómez, M. del C.; Gutiérrez Miceli, F. A.; Ruiz Lau, N.; Santana Buzzy, N. Organogénesis Directa En Piña Criolla Inducida Por 6-Bencilaminopurina. *Rev Mex De Cienc Agric* **2023**, *14* (6), e3159. <https://doi.org/10.29312/remexca.v14i6.3159>.

- (27) Muñoz Mora Nayely Michel. "Situación Actual de La Comercialización Del Cultivo de Piña (Ananas Comosus) En El Ecuador, UNIVERSIDAD TÉCNICA DE BABAHOYO, Babahoyo , 2023.
- (28) Padilla Duarte Emilseth Carolina. Caracterización Socioeconómico y Fitosanitario En Sistemas de Producción En El Cultivo de Piña (Ananas Comosus L. Merrill) Ticuantepe, Managua, Nicaragua, 2018, universidad nacional agraria, Mangua , 2021.
- (29) Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. *Principales Hallazgos de La Publicación "Adaptación al Cambio Climático En La Industria de Las Frutas Tropicales - Guía Técnica Para Productores y Exportadores de Aguacate y Piña"*.; Roma, 2023.
- (30) Bello Amez, S.; Borjas Ventura, R.; Alvarado Huamán, L.; Bello Medina, N.; Castro-Cepero, V.; Julca-Otiniano, A. La Mosca de La Fruta de La Piña (Melanoloma Viatrix Hendel) Asociada a La Mancha Con Galerías y Experiencias de Control En La Selva Central Del Perú. *Idesia (Arica)* **2020**, 38 (4), 37–46. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292020000400037>.
- (31) Catucuago, J. EVALUACIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE LA ENZIMA BROMELINA A PARTIR DE DESECHOS DE PIÑA (Ananas Comosus). Tesis de grado, UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE, Ibarra, 2023.
- (32) Huamaní, L. Contenido de Bromelina En La Cáscara de Ananas Comosus "Piña" y Su Relación Con La Madurez Del Fruto. Tesis de grado, UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA, Ayacucho, 2019.
- (33) Mendoza-Rojas, P. A.; Pardavé-Livia, W. Caracterización Físico-Químico de La Cáscara de Piña (Ananas Comosus) Tipo Perolera Del Departamento de Santander. *Revista Politécnica* **2023**, 19 (38), 143–159. <https://doi.org/10.33571/rpolitec.v19n38a9>.
- (34) Hernández, G.; Ortega, E.; Ortega, I. Composición Nutricional y Compuestos Fitoquímicos de La Piña (Ananas Comosus) y Su Potencial Emergente Para El Desarrollo de Alimentos Funcionales. *Boletín de Ciencias Agropecuarias del ICAP* **2021**, 7, 1–5.
- (35) Chinchilla, M. J. "Acción de La Enzima Bromelina En La Disgregación de Hematomas y Disminución de La Inflamación." Tesis de grado, Universidad de San Carlos de Guatemala, Ciudad de Guatemala, 2014.
- (36) Chakraborty, A.; Mitra, S.; Tallei, T.; Tareq, A.; Nainu, F.; Cicia, D.; Dhama, K.; Emran, T.; Simal-Gandara, J.; Capasso, R. Bromelain a Potential Bioactive Compound: A

- Comprehensive Overview from a Pharmacological Perspective. *Life* **2021**, *11* (4), 317. <https://doi.org/10.3390/life11040317>.
- (37) Acosta, A.; Castellanos, A.; Martínez, A.; Ramírez, E.; Sánchez, M.; López, D.; Martín, A. La Bromelina y Su Aplicación Terapéutica Antiinflamatoria En Humanos: Una Revisión de Alcance. *Nutrición clínica y dietética hospitalaria* **2023**, *43* (2).
- (38) Gallardo, L.; Sánchez, A.; Montalvo, C.; Alonso, A. Extracción de Bromelina a Partir de Residuos de Piña. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos* **2008**, *18*, 15.
- (39) Salud, N. Y. D. *Bromelina*. Salud, Nutrición y Deporte.
- (40) Batool, I.; Iqbal, A.; Imran, M.; Ramzan, M.; Anwar, A. Design and Applications of Enzyme-Linked Nanostructured Materials for Efficient Bio-Catalysis. *Top Catal* **2023**, *66* (9–12), 649–675. <https://doi.org/10.1007/s11244-022-01770-8>.
- (41) Thakur, N.; Goyal, M.; Sharma, S.; Kumar, D. Proteases: Industrial Applications and Approaches Used in Strain Improvement. *ResearchGate* **2019**, *9*, 1–11.
- (42) Souza, P. M.; Werneck, G.; Aliakbarian, B.; Siqueira, F.; Ferreira Filho, E. X.; Perego, P.; Converti, A.; Magalhães, P. O.; Junior, A. P. Production, Purification and Characterization of an Aspartic Protease from *Aspergillus Foetidus*. *Food and Chemical Toxicology* **2017**, *109*, 1103–1110. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.055>.
- (43) Pereira, I. C.; Pedrosa-Santos, Á. M. C.; Martins, J. A.; Sousa, A. A. de; Nobre, T. A.; Torres, L. R. de O.; Silva, F. C. C. da; Severo, J. S.; Sousa, J. M. de C. e; Torres-Leal, F. L. BROMELAIN AND LIVER HEALTH: A COMPREHENSIVE SYSTEMATIC REVIEW OF PRECLINICAL STUDIES. *Clin Nutr ESPEN* **2025**. <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2025.02.001>.
- (44) INCI Beauty. *Bromelain*. INCI Beauty.
- (45) Abreu, D. C. A.; Figueiredo, K. C. de S. BROMELAIN SEPARATION AND PURIFICATION PROCESSES FROM PINEAPPLE EXTRACT. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* **2019**, *36* (2), 1029–1039. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20190362s20180417>.
- (46) Arroyo, M.; Acebal, C.; De la Mata, I. Biocatálisis y Biotecnología. *Arbor* **2014**, *190* (768), a156. <https://doi.org/10.3989/arbor.2014.768n4010>.
- (47) Tang, Y.; Scher, H. B.; Jeoh, T. Microencapsulation of Bromelain from Pineapple Extract Powder by Industrially Scalable Complex Coacervation. *LWT* **2022**, *167*, 113775. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113775>.

- (48) Vega, K. Extracción de Bromelina Obtenida a Partir de Residuos Del Procesamiento de Piña (Ananas Comosus). Tesis de grado, Escuela Politécnica Nacional, Quito, 2017.
- (49) Stea, M. *Citrato de Sodio*. Lifeder.
- (50) Fernández Reyes, E.; Galván Cejudo, A. 27. Métodos Para La Cuantificación de Proteínas. *E-Gnosis*. Córdoba April 7, 2005, pp 1–7. <https://docplayer.es/20650269-27-metodos-para-la-cuantificacion-de-proteinas.html> (accessed 2024-07-14).
- (51) Langyan, S.; Bhardwaj, R.; Radhamani, J.; Yadav, R.; Gautam, R. K.; Kalia, S.; Kumar, A. A Quick Analysis Method for Protein Quantification in Oilseed Crops: A Comparison With Standard Protocol. *Front Nutr* **2022**, 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.892695>.
- (52) Sánchez Amador, S. A. Método de Bradford: ¿Qué Es y Cómo Funciona? *Psicología y Mente* **2021**, 1.
- (53) Miranda, M. P. Comparison of the Effect of Sodium Chloride Concentration on Protein Determination: Bradford and Biuret Methods. *Anal Biochem* **2024**, 687, 115450. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2023.115450>.
- (54) Forero Villamil, W. N.; Ramírez Cuervo, C.; Molina Castillo, O. *Cuantificación de Proteínas Por El Método de Bradford*; Medellín, 2022.
- (55) Bradford, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* **1976**, 72 (1–2), 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.
- (56) Torres, M. *Métodos Para Análisis de Proteína (Ley 20606)*; Santiago , 2016.
- (57) Supelco. *Proteínas: Según El Método de Bradford*. Art. 1.10306.0500.; Darmstadt, 2020.
- (58) Khan Academic. *Repaso de enzimas*. Khan Academic.
- (59) ITS Paysandú. *Factores Que Afectan La Actividad Enzimática*; Paysandú, 2020.
- (60) Toxqui, C. G.; Avitia, R. L.; Ángeles, Á. G.; Robles, A. C.; Hernández, I. D. Z. Inocuidad En Alimentos Mediante La Liofilización. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research* **2024**, 7 (3), e71888. <https://doi.org/10.34188/bjaerv7n3-049>.
- (61) Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario. INSTRUCTIVO PARA LA LIMPIEZA DE SUPERFICIES EN CONTACTO CON ALIMENTOS, TRANSPORTE DE ALIMENTOS EN SU ESTADO PRIMARIO Y ALIMENTOS EN GENERAL PREVIO AL CONSUMO. **2014**.

ANEXOS

Anexo A. Recepción de Materia prima



Fuente: Elaboración propia

Anexo B. Extracción y Filtración de las materias primas



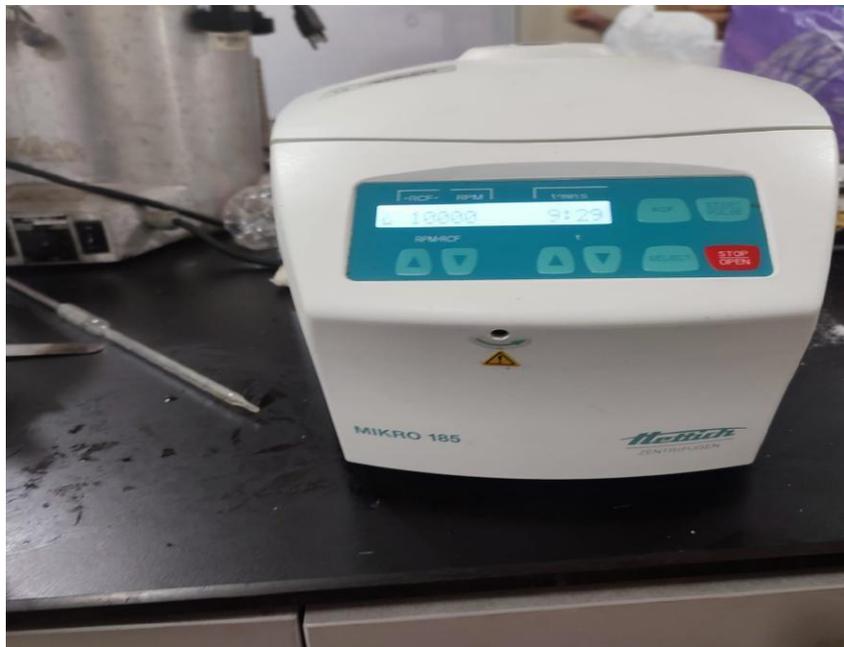
Fuente: Elaboración propia

Anexo C. Aplicación del Reactivo de Bradford



Fuente: Elaboración propia

Anexo D. Centrifugado de las muestras



Fuente: Elaboración propia

Anexo G. Absorbancia resultante de las muestras en el espectrofotómetro uv visible



Fuente: Elaboración propia