



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERIA**  
**EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGIA**  
**CARRERA DE ALIMENTOS**



---

Análisis de la actividad enzimática de la bromelina obtenida a partir de residuos agroindustriales de la piña (*Ananas comosus*)

---

Trabajo de Titulación, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de La Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

**Autora:** Tatiana Abigail Garces Oñate

**Tutora:** Dra. Mayra Liliana Paredes Escobar

**Ambato – Ecuador**

**Septiembre 2023**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

Dra. Mayra Liliana Paredes Escobar

### **CERTIFICA**

Que el presente Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 21 de julio de 2023

---

**Dra. Mayra Liliana Paredes Escobar**

**C.I: 0501873954**

**TUTORA**

## **AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

Yo, Tatiana Abigail Garces Oñate, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



---

Tatiana Abigail Garces Oñate

**C.I:** 1805362041

**AUTORA**

## **DERECHOS DE AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Trabajo de Titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedemos los Derechos en línea patrimoniales de mi Trabajo final de Titulación, con fines de difusión pública, además aprobamos la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



---

Tatiana Abigail Garces Oñate

**C.I:** 1805362041

**AUTORA**

## **APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO**

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación, mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

---

Presidente del Tribunal

---

Mg. Sánchez Garnica Manoella Alejandra  
C.I. 0604079871

---

Dr. Vilcacundo Chamorro Rubén Darío  
C.I. 1802738102

Ambato, 23 de agosto de 2023

## DEDICATORIA

*Al Todopoderoso, quien me acompañó en este viaje de aventuras y adversidades vividas, dejándome valiosos conocimientos.*

*A mis amados padres.*

*A mis queridos hermanos.*

*A mis adoradas tías.*

*A mis ángeles.*

*Por ser: amor, esperanza y confianza en mi vida.*

## AGRADECIMIENTO

A:

*La fuerza divina.*

*Mis padres y hermanos.*

*La Universidad Técnica de Ambato.*

*La Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y  
Biotecnología, conjuntamente con sus docentes.*

*La Dra. Mayra Liliana Paredes Escobar.*

*La Dra. Dayana Cristina Morales Acosta.*

*Mis estimados compañeros y futuros colegas.*

*Por toda su ayuda y gratos momentos compartidos.*

*Gracias infinitas, por haber sido, apoyo, guía, motivación, inspiración y fortaleza.*

*Especialmente, por sus, consejos y enseñanzas.*

*Mis más sinceras muestras de cariño y gratitud.*

*Un porvenir lleno de éxitos, ¡Os deseo!*

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

<b>APROBACIÓN DEL TUTOR</b> .....	<b>ii</b>
<b>AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN</b> .....	<b>iii</b>
<b>DERECHOS DE AUTOR</b> .....	<b>iv</b>
<b>APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO</b> .....	<b>v</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>vi</b>
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	<b>vii</b>
<b>ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS</b> .....	<b>viii</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS</b> .....	<b>xi</b>
<b>RESUMEN EJECUTIVO</b> .....	<b>xiii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xiv</b>
<b>CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>1</b>
1.1.    Antecedentes Investigativos .....	1
1.1.1.    Problemática ambiental causada por los residuos agroindustriales .....	1
1.1.1.1. Residuos agroindustriales .....	2
1.1.2.    La piña .....	2
1.1.2.1. Origen .....	3
1.1.2.2. Clasificación taxonómica.....	3
1.1.2.3. Contenido nutricional .....	4
1.1.2.4. Usos y aplicaciones.....	5
1.1.2.5. La industria procesadora de piña .....	5
1.1.2.6. Subproductos que generan las industrias procesadoras de piña.....	5
1.1.3.    Enzimas.....	7
1.1.3.1.    Bromelina.....	10
1.1.3.2. Aplicación de la bromelina en la industria .....	11



1.1.4.	Extracción de enzimas .....	12
1.1.4.1.	Conservación de la enzima .....	13
1.1.4.2.	Liofilización.....	14
1.1.5.	Cuantificación Proteica.....	14
1.1.5.1.	Método Kjeldahl .....	14
1.1.6.	Actividad enzimática.....	15
1.1.6.1.	Ensayo espectrofotométrico.....	15
1.1.	Objetivos.....	16
1.2.1.	Objetivo general .....	16
1.2.2.	Objetivos específicos.....	16
<b>CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA.....</b>		<b>17</b>
2.1.	Materiales .....	17
2.1.1.	Materiales .....	17
2.1.2.	Materia prima .....	17
2.1.3.	Reactivos .....	17
2.1.4.	Equipos.....	18
2.1.5.	Recursos tecnológicos .....	18
2.2.	Métodos .....	19
2.2.1.	Extracción de la bromelina a partir de residuos agroindustriales de la piña ( <i>Ananas comosus</i> ) (Cáscara y Corazón).....	19
2.2.2.	Determinación del rendimiento de la bromelina obtenida a partir de residuos agroindustriales de la piña ( <i>Ananas comosus</i> ) (Cáscara y corazón) .....	20
2.2.3.	Cuantificación de la concentración proteica de la enzima obtenida a partir de residuos agroindustriales de la piña ( <i>Ananas comosus</i> ) (Cáscara y corazón) .....	21
2.2.4.	Evaluación de la actividad enzimática de la bromelina obtenida a partir de residuos agroindustriales de la piña ( <i>Ananas comosus</i> ) (Cáscara y corazón). .....	23
<b>CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>		<b>26</b>
3.1.	Análisis y discusión de resultados .....	26

3.1.1. Obtención del extracto enzimático .....	26
3.1.2. Determinación del rendimiento del extracto enzimático obtenido.....	29
3.1.3. Cuantificación proteica del extracto obtenido .....	32
3.1.4. Determinación de la actividad enzimática de la bromelina.....	34
<b>CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>38</b>
4.1. Conclusiones.....	38
4.2. Recomendaciones .....	39
<b>C. MATERIAL DE REFERENCIA.....</b>	<b>40</b>
Referencias bibliográficas .....	40
Anexos	50

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica de la planta de piña .....	3
<b>Tabla 2.</b> Contenido nutricional de la piña .....	4
<b>Tabla 3.</b> Composición nutricional y química de los subproductos de la piña .....	6
<b>Tabla 4.</b> Clasificación general de las enzimas .....	9
<b>Tabla 5.</b> Aplicaciones de la bromelina en la industria.....	11
<b>Tabla 6.</b> Peso y rendimiento del extracto enzimático liofilizado .....	29
<b>Tabla 7.</b> Contenido de proteína en las muestras .....	32
<b>Tabla 8.</b> Resultados de la actividad enzimática de las muestras de bromelina .....	35
<b>Tabla 9.</b> Variación de absorbancia calculada a partir de la pendiente de la recta .....	56
<b>Tabla 10.</b> Resultados de Absorbancia de las muestras analizadas .....	59

### ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mecanismo de la actividad enzimática .....	8
<b>Figura 2.</b> Estructura química de la bromelina .....	10
<b>Figura 3.</b> Extractos enzimáticos obtenidos. <b>A:</b> Muestra obtenida a partir de la pulpa. <b>B:</b> Muestra obtenida del corazón. <b>C:</b> Muestra de la cáscara de piña .....	26
<b>Figura 4.</b> Volúmenes de los extractos enzimáticos obtenidos.....	28
<b>Figura 5.</b> Diferencia de los extractos enzimáticos antes y después de la liofilización .....	30
<b>Figura 6.</b> Bromelina Liofilizada. <b>A:</b> Muestra de la pulpa. <b>B:</b> Muestra del corazón.	31
<b>Figura 7.</b> Porcentaje de proteína presente .....	33
<b>Figura 8.</b> Residuos de Piña (corazón y cáscara).....	50

<b>Figura 9.</b> Troceado de muestras (corazón y cáscara) .....	51
<b>Figura 10.</b> Muestras homogenizadas (pulpa, corazón y cáscara) .....	51
<b>Figura 11.</b> Precipitación del extracto de homogeneizado con etanol al 96% .....	52
<b>Figura 12.</b> Eliminación de bagazo y restos sólidos de mayor tamaño .....	52
<b>Figura 13.</b> Muestras centrifugadas .....	53
<b>Figura 14.</b> Filtración del precipitado .....	53
<b>Figura 15.</b> Liofilización de los extractos proteicos .....	54
<b>Figura 16.</b> Preparación de soluciones, diluciones y medida de absorbancia en el espectrofotómetro.....	56
<b>Figura 17.</b> Regresión lineal de las muestras con Baño Ultrasónico .....	57
<b>Figura 18.</b> Regresión lineal de las muestras con Agitación Magnética.....	57

## RESUMEN EJECUTIVO

En el país, las agroindustrias procesadoras de piña, además, de generar variedad de productos, obtienen gran cantidad de residuos, como: coronas, cáscaras y corazones, que no son tratados apropiadamente y pueden causar un impacto negativo al medio ambiente. Sin embargo, desconocen los compuestos bioactivos que presentan, como, la bromelina, que puede ser aprovechada. Por ello, la presente investigación tuvo como objetivo analizar la actividad enzimática de la bromelina en polvo obtenida de la pulpa (muestra control), cáscara y corazón de la piña.

Para obtener la enzima, se utilizó el método de extracción líquido-líquido usando etanol al 96 por ciento para su precipitación. Los extractos se centrifugaron y filtraron, luego se ultracongelaron y liofilizaron. Se calculó sus rendimientos. La pulpa, presentó mayor rendimiento (1, 81 por ciento). A continuación, se cuantificó el contenido de proteína, empleando el método Kjeldahl. La cáscara (7, 34 por ciento) presentó mayor porcentaje, a diferencia del corazón (5, 18 por ciento). Por otro lado, con los datos de absorbancia obtenidos en el espectrofotómetro se calculó la actividad enzimática luego de la reacción entre la enzima (bromelina) y el sustrato (caseína). La muestra del corazón presentó mejor actividad enzimática total: 169, 74 micromol sobre minuto por mililitro y específica de 0,000328 mol sobre minuto por miligramo en relación a las demás muestras.

Finalmente, se encontró que, la bromelina obtenida de residuos del corazón de la piña, podría generar un valor agregado en futuras investigaciones, al incorporarla en un producto alimenticio, otorgándole características funcionales debido su acción proteolítica.

**Palabras clave:** Gestión de residuos, subproductos de la piña, Bromelina, actividad enzimática.

## ABSTRACT

In the country, pineapple processing agro-industries, in addition to generating a variety of products, generate a large amount of waste, such as crowns, peels, and cores, which are not treated appropriately and can have a negative impact on the environment. However, they are unaware of the bioactive compounds that they contain, such as bromelain, which can be used. Therefore, this study aimed to analyze the enzymatic activity of bromelain powder obtained from pineapple pulp (control sample), peel, and core.

To obtain the enzyme, the liquid-liquid extraction method was used with 96 percent ethanol for precipitation. The extracts were then centrifuged, filtered, flash-frozen, and freeze-dried. Yields were calculated. The pulp had the highest yield (1.81 per cent). Protein content was quantified using the Kjeldahl method. The peel (7.34 per cent) had the highest percentage, in contrast to the heart (5.18 per cent). On the other hand, with the absorbance data obtained from the spectrophotometer, the enzyme activity was calculated after the reaction between the enzyme (bromelain) and the substrate (casein). The heart sample showed better total enzyme activity: 169, 74 micromol over minute per millilitre and specific activity of 0.000328 mol over minute per miligram in relation to the other samples.

Finally, it was found that bromelain obtained from pineapple core residues could generate added value in future research by incorporating it into a food product, giving it functional characteristics owing to its proteolytic action.

**Key words:** Waste management, pineapple by-products, bromelain, enzymatic activity.

## CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

### 1.1. Antecedentes Investigativos

#### 1.1.1. Problemática ambiental causada por los residuos agroindustriales

El sector agroalimentario con su industrialización ha generado un alto impacto en productividad y comercialización durante los últimos años (**Kumar et al., 2022**). En consecuencia, a nivel mundial, se ha producido más volumen de residuos agroindustriales que en toda la existencia de la humanidad (**Rosero-Delgado et al., 2021**). De hecho, según Riera et al., 2018, citado por **Aguiar Novillo et al., (2022)** anualmente el Ecuador reporta aproximadamente 2,2 millones de toneladas de residuos agroindustriales, siendo gran parte de ellos restos del procesamiento de frutas y vegetales, generalmente; hojas, tallos, semillas y cáscaras. Mismos que al tener gran cantidad de humedad, carga microbiana presentan una de las principales preocupaciones para el entorno (**Rico et al., 2020**). A pesar de ser residuos orgánicos, al no tener un adecuado manejo para su eliminación, generan problemas ambientales, porque su descomposición causa gases de efecto invernadero (**ONU, 2018**). Además, generan la contaminación de agua por lixiviados, malos olores y la proliferación de ratas e insectos (**Vargas Corredor & Pérez Pérez, 2018**).

Pero es importante mencionar que, debido a sus características químicas, físicas y biológicas, los residuos agroindustriales tienen diversas aplicaciones (**Aguiar Novillo et al., 2022**). En este sentido, ha surgido el ingenio de buscar nuevas alternativas para disminuir la contaminación ambiental por medio de su aprovechamiento al obtener coproductos y/o extraer compuestos bioactivos, brindando con ello un buen trato al ambiente (**González Salcedo, 2021**). A su vez, promoviendo una economía circular (**Romero-Sáez, 2022**).

### **1.1.1.1. Residuos agroindustriales**

Según la **FAO & FAOLEX, (2020)** el término residuo, hace referencia a todo material en estado sólido, líquido o gas, el cual es desechado por quien lo genera. Pero puede ser o no aprovechado y/o tratado adecuadamente para su disposición final. La **ONU & FAOLEX, (2020)** define como residuo aprovechable a cualquier objeto, sustancia ya sea de origen inorgánico y orgánico que no tiene valor para quien lo produce, pero está dispuesto a ser empleado en otros procesos productivos siendo revalorizados. A su vez, los residuos orgánicos son aquellos que poseen características biodegradables como restos de alimentos derivados de vegetales, frutas y animales, pueden ser cáscaras, carnes y entre otros (**TULSMA, 2017 como se citó en INEC, 2021**). Por otra parte, las agroindustrias son establecimientos que se dedican a la transformación y procesamiento de materias primas agrícolas, pesqueras, pecuarias y forestales, en productos aptos para su consumo. (**FAO, 2013 citado en Camacho Gómez, 2018**).

Por tanto, los residuos agroindustriales se los definen como una gran variedad de desechos producidos por las industrias agroalimentarias, mismos que se les debe dar un adecuado tratamiento final para evitar perjuicios al ambiente o ser aprovechados (**Cortez & Ligabue-Braun, 2021**). Denominados también como biomasa originada a partir del procesamiento de materia orgánica proveniente del cultivo de plantas, manejo de animales, y procesamiento de hortalizas y frutas (**Rojas et al., 2019**).

### **1.1.2. La piña**

La piña es una planta herbácea frutal, (**Wali, 2019**). Está conformada por un tallo corto y un conjunto de hojas gruesas, espinosas que se sitúan a su entorno (**Mohammad et al., 2020**). En la parte superior se encuentra la corona que son la unión de varias hojas alargadas en forma de espada (**Agrihortico CPL, 2021**). En la parte inferior se sitúa el pedúnculo, en donde, a partir de la inflorescencia de un racimo con más de cien flores que son fusionadas en la fructificación, dan lugar a la formación del fruto (**UNCTAD, 2016**). El fruto, según su



estado de maduración conforma colores desde verdes hasta anaranjados, presenta un sabor dulce ligeramente ácida, pulpa jugosa-carnosa y olor agradable (INEN, 2016).

#### 1.1.2.1. Origen

Según Sanewski et al., (2018) se sabe que, antes del descubrimiento de la fruta por parte de los españoles, la piña ya se incluía en la dieta de los nativos de las tierras bajas, siendo originaria de América tropical (Ventura et al., 2018). Se encontraba distribuida en la costa de Brasil al entorno del Río de Janeiro y el Caribe. Collings, 1960, citado en Wali, (2019) menciona que, la piña tiene su origen en Brasil, Paraguay y Colombia, y que, paulatinamente fue siendo exportada a diferentes partes del mundo a través de los españoles, viajeros e historiadores. Ya para el siglo XVI, la piña se localizaba en diversos países que incluían Filipinas, Indias, China, Inglaterra, Holanda y hasta las costas africanas, esto fue posible gracias a las características de supervivencia a diferentes condiciones ambientales que poseía la planta (Morton and Dowling, 2013; Purseglove, 1975 citado en Wali, 2019).

#### 1.1.2.2. Clasificación taxonómica

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de la planta de piña

<b>Reino</b>	Vegetal
<b>División</b>	Angiospermas
<b>Clase</b>	Monocotiledóneas
<b>Subclase</b>	Commelínidas
<b>Orden</b>	Poales
<b>Familia</b>	Bromeliaceae
<b>Género</b>	<i>Ananas</i>
<b>Especies</b>	<i>A.comosus</i>
<b>Nombre binomial</b>	<i>Ananas comosus</i>

**Fuente:** Agrihortico CPL, (2021).

### 1.1.2.3. Contenido nutricional

**Tabla 2.** Contenido nutricional de la piña

<b>Nutrientes/100 g</b>	
Agua	85, 46 %
Energía	60 Kcal
Proteína	0, 46 g
Nitrógeno	0, 07 g
Azúcares totales	11, 4 g
Grasa total	0, 21 g
Carbohidratos	14, 1 g
Fibra dietética total	0, 9 g
<b>Vitaminas</b>	
Vitamina A	3 IU
Tiamina (Vitamina B1)	0, 064 mg
Riboflavina (Vitamina B2)	0, 03 mg
Niacina (Vitamina B3)	0, 228 mg
Ácido ascórbico (Vitamina C)	58, 6 mg
Alfa-tocoferol (Vitamina E)	0, 02 mg
Filoquinona(Vitamina K)	0, 7 ug
<b>Minerales</b>	
Ceniza	0, 25 g
Potasio	137 mg
Sodio	1 mg
Zinc	0, 11 mg
Magnesio	13, 4 mg
Calcio	12 mg
Fosfato	5 mg
Hierro	0, 05 mg

**Fuente:** USDA, 2022 & Hernández Ramírez et al., (2021).

#### **1.1.2.4. Usos y aplicaciones**

El hombre nativo de América utilizaba la piña en la elaboración de bebidas alcohólicas como el guarapo, chicha y el vino de piña, también, en la producción de fibra y, en aplicaciones medicinales como: antiemético, emenagogo, vermífugo, abortivo y para trastornos estomacales, incluso usaban para reducir hinchazones, heridas, rasguños (**Agrihortico CPL, 2021**). Usos que lo han relacionado con la enzima proteolítica que contiene el fruto (**Hernández Ramírez et al., 2021**). Además, empleaban piñas podridas en la extracción de sustancias venenosas usadas para untar en lanzas para las guerras (**Sanewski et al., 2018**).

#### **1.1.2.5. La industria procesadora de piña**

Con la industrialización y la evolución humana, la industria procesadora de piña también se ha transformado, buscando métodos para conservación e innovación (**Mohd Ali et al., 2020**). En consecuencia, **Mohd et al., (2018)** menciona que, existe en los mercados una amplia variedad de productos derivados de la piña, destacándose, los concentrados, jugos, néctares, siropes, purés, pulpas, piñas deshidratadas, confituras, gelatina de confitería, enlatadas con almíbar, frescos, caramelos, dulces, mermeladas, helados, vinagre, licor (**Cannon & Ho, 2018**) piñas en rodajas (Chaudhary et al., 2019). Incluso como polvo instantáneo y aditivo saborizante (**Priyadarshani et al., 2019**).

#### **1.1.2.6. Subproductos que generan las industrias procesadoras de piña**

Según **Santos et al., (2021)** a nivel mundial, las industrias de piña, además, de generar una gran variedad de productos originan subproductos, siendo del 30 al 50% no aprovechados (**Rico et al., 2020**). Entre los cuales se encuentran las cáscaras (29 – 40 %) y corazones (9 – 10 %) (**Eixenberger et al., 2022**). También, restos de hojas, coronas y tallos. En el Ecuador, las procesadoras de piña, al igual que las industrias hortofrutícolas desconocen el aporte

nutricional de dichos subproductos por lo que, no tienen un adecuado tratamiento para su aprovechamiento y son depositados en botaderos (**Riera et al., 2018**).

**Tabla 3.** Composición nutricional y química de los subproductos de la piña

<b>Componente</b>	<b>Corona</b>	<b>Cáscara</b>	<b>Corazón</b>	<b>Hojas</b>
Humedad (%)	70 - 75	92,2 – 91	65 - 70	70 - 90
Sólidos totales (%)	-	7,80 – 93.6	-	-
Fibra (%)	-	23,71	2 - 4	-
Grasa (%)	-	0,46	-	-
Proteína (%)	4,20 -11,0	5 - 6,9	2,1 - 5	5
Fructosa (%)	0,82 – 0,05	-	-	-
Glucosa (%)	0,53 – 0,02	-	-	-
Celulosa (%)	54,03	14,9	-	41,15
Hemicelulosa (%)	20,86	29,39	-	21,02
Lignina (%)	8,6	6,35	-	13,05
Carbono total (%)	39,52	40,80	-	-
Nitrógeno total (%)	13,82	0,99	-	-
Potasio (g/kg)	0,37	4,6	-	-
Calcio (g/kg)	0,091	339,4	-	-
Magnesio (g/kg)	0,0203	0,013	-	-
Ceniza (%)	4- 7,9	5,05	0,7	-

**Fuente:** ( **Aili Hamzah et al., 2021; Eixenberger et al., 2022; Nath et al., 2023; Roda & Lambri, 2019; Pereira et al., 2022; Sadh et al., 2018**).

Las tablas 2 y 3 indican la composición nutricional de la piña y sus residuos. En donde, el fruto contiene carbohidratos y agua, siendo fuentes vitales de fibra dietética, ácidos orgánicos, vitaminas, minerales y azúcares (**Mohd Ali et al., 2020**). Con respecto a los subproductos, presentan cantidades considerables de lignina, celulosa, hemicelulosa y

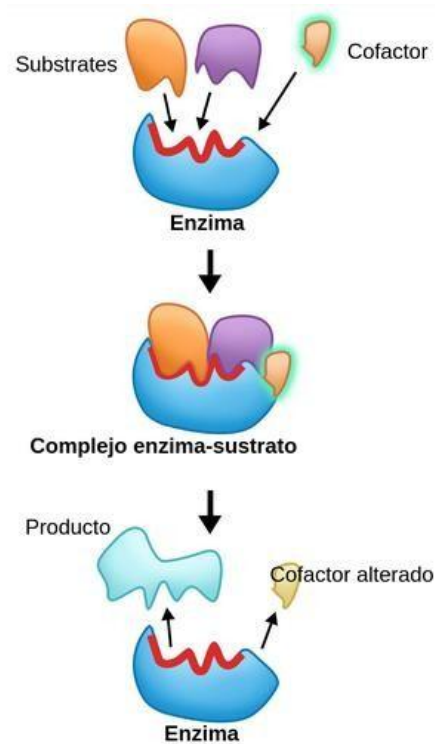
proteínas (**Roda & Lambri, 2019; Sath et al., 2018**). Además, contienen entre el 25 al 60% del peso del fruto, que se componen por rastrojos, semillas, pulpa, piel y coronas (**Rico et al., 2020**). Mismas que, tienen proteínas, azúcares, vitaminas, fibra, lípidos, y compuestos bioactivos como los compuestos fenólicos, antocianinas, taninos, carotenoides (**Hernández Ramírez et al., 2021**). También las partes de la piña contienen enzimas proteolíticas denominadas bromelina, siendo este último, el compuesto bioactivo más valioso **Mohd Ali et al., (2020)**.

Considerando el gran aporte nutricional, vitamínico, y compuestos bioactivos que contienen la piña y los residuos, su aprovechamiento podría proporcionar una nueva fuente de ingreso económico al ser reutilizados. Según **Aili Hamzah et al., (2021)** los subproductos de la piña presentan importantes fuentes nutricionales que han venido siendo estudiados a nivel internacional para poder darle algún valor agregado. Por ejemplo, **Barrera et al., (2020)** han utilizado restos de la piña para producir bioetanol, alimentos para animales (**Ramírez-Ramírez et al., 2021**); películas comestibles (**Franco-Maya et al., 2018**); y Aerogeles para conservar frutas (**Las Provincias, 2021**). En el estudio de **Rahma et al., (2019)** ocuparon el tallo de la piña a base de almidón como fuente de excipiente farmacéutico (desintegrante de tabletas y aglutinante). Sin embargo, en el país no se ha aprovechado sus enzimas proteolíticas, como es la bromelina (**Wali, 2019**).

### **1.1.3. Enzimas**

**NIH, (2023)** define a la enzima como un catalizador biológico, tienen la función de acelerar la velocidad de reacciones químicas específicamente en la célula, no es destruida cuando se da una reacción y puede ser utilizada otra vez. La célula puede contener diferentes tipos de moléculas enzimáticas que son específicas para cada reacción química.

**Badui Dergal, (2020)** señala que, las enzimas son proteínas que llevan a cabo reacciones bioquímicas con velocidades sumamente altas, y tiene un eminente grado de especificidad. Conforman una estructura tridimensional globular y presentan actividad cuando poseen una conformación espacial que ayuda a tener una disposición óptima de los aminoácidos presentes en el sitio catalítico. La utilización de enzimas en el procesamiento de alimentos se ha originado desde varios siglos atrás, cuando las civilizaciones antiguas envolvían carne con ciertas hojas de plantas, lo que facilitaba la acción de proteasas vegetales como la papaína, ficina y bromelina, sobre las proteínas de tejidos animales ayudando al ablandamiento para ser ingeridas.



**Figura 1.** Mecanismo de la actividad enzimática.

**Fuente:** LABSTER, (2021).

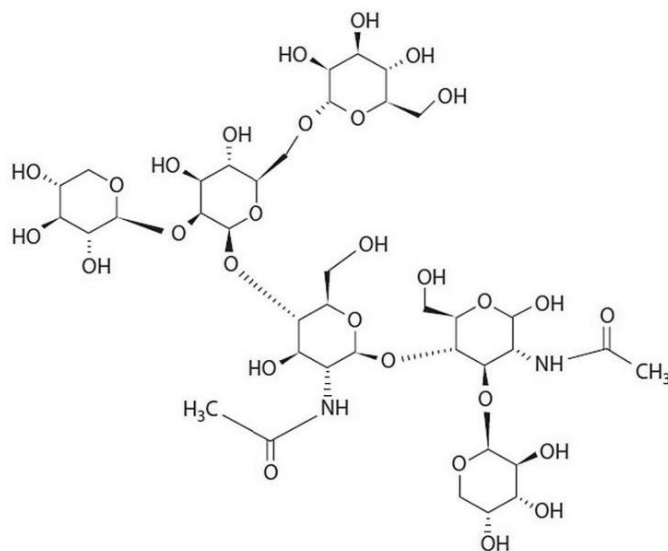
**Tabla 4.** Clasificación general de las enzimas

<b>Grupo</b>	<b>Reacción que cataliza</b>	<b>Subgrupos</b>	<b>Ejemplos</b>
Oxidorreductasas	Óxido - reducción	Deshidrogenasas Peroxidasas Reductasas	Malato deshidrogenasa Glucosa oxidasa
Transferasas	Transferir grupos químicos entre compuestos	Glicotrasnferasas Fosfotrasferasas	Asparato - aminotrasnferasa
<b>Hidrolasas</b>	Rompen enlaces covalentes	Amilasas Esterasas Glucosidasas <b>Proteasas</b> Tiolasas Fosfatasas	<b>Bromelina</b> Papaína
Liasas	Catalizan reacciones de rotura	Descarboxilasas Deshidratasas Pectinaliasas Hidratasas	Piruvato - descarboxilasa
Isomerasas	Catalizan cambios estructurales y geométricos	Epimerasas Racemasas	Triofosfato - isomerasa
Ligasas	Unión covalente de dos moléculas	Sintetasas Carboxilasas	ADN - ligasa

**Fuente: Badui Dergal, (2020).**

### 1.1.3.1. Bromelina

El término bromelina hace referencia a un conjunto de enzimas que están en el fruto, tallo y, hojas de la planta de piña perteneciente al grupo de hidrolasas siendo una proteasa (NIH, 2023a). También conocida como enzima que hidroliza proteína (NIH, 2023b). La Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos, define a la bromelina como una enzima proteolítica, es decir, que rompen las moléculas de las proteínas, cumple una función digestiva cuando es consumida ya que se encarga de descomponer las proteínas en aminoácidos (Chaudhary et al., 2019).



**Figura 2.** Estructura química de la bromelina.

**Fuente:** Mohd Ali et al., (2020).

Según Dutt Tripathi et al., ( 2022) entre las características bioquímicas y físicas de la bromelina, es que está conformada por un conjunto de diversos tioles endopeptidasas y otros componentes como glucosidasa, celulasa, peroxidasa, escarasa, fosfatasa e inhibidores de proteasa (Agrawal et al., 2022). La enzima proveniente del tallo se la denomina como EC



3.4.22.32, mientras que, la del fruto es conocida con número EC 3.4. 22.33. Igualmente, sus pesos moleculares varían: 24,5 a 32 kDa de la fruta y de 26 a 37 kDa del tallo (**Hikisz & Bernasinska-Slomczewska, 2021**). La temperatura óptima para su activación va de 30 a 70 °C. Mientras que, el rango de pH para su mayor actividad enzimática varía de 3 a 8 (**Benefo & Ofosu, 2018**).

### 1.1.3.2. Aplicación de la bromelina en la industria

Varios estudios han demostrado las aplicaciones de la bromelina para diferentes fines industriales y clínicos por sus propiedades, antimicrobianas (**Abbas et al., 2021**), antiinflamatorias (**Bottega et al., 2021**), antioxidantes (**Rivera et al., 2022**), anticancerígenas, antibióticos, analgésicos (**Varilla et al., 2021**) e inclusive como agentes cardioprotectores (**Mohd Ali et al., 2020**).

**Tabla 5.** Aplicaciones de la bromelina en la industria

<b>Tipo de industria</b>	<b>Aplicación</b>	<b>Acción</b>
<b>Alimentaria.</b>	Productos alimentarios.	Aditivo.
Cárnica.	Proteólisis en carne de ovino, bovino, y calamar.	Ablandar.
Panificación.	Pan.	Cambia las propiedades del gluten, mejora la solubilidad, relajación de masas.

---

Bebidas alcohólicas.	Cervezas.	Clarificar, mejorar la estabilidad proteica
Alimentación animal.	En cereales, concentrados proteicos, forrajes, ensilados y henos.	Degradación de proteínas en el rumen.
	Productos de higiene bucal y dental: dentífricos.	Blanqueamiento.
Cosmética.	Productos para la piel: acné y arrugas.	Digiere proteína de células muertas.
	Hinchazón, hematomas.	Reducir
Farmacéutica.	Tratar edemas e inflamaciones	Disuelve la fibrina y coágulos de sangre.
Textil.	Cocción del capullo de seda.	Disminuye el tiempo de ablandamiento.

---

**Fuente: BPS et al., 2023; Varilla et al., (2021).**

#### **1.1.4. Extracción de enzimas**

El constante interés de la utilización de la bromelina en diferentes aplicaciones ha propiciado su extracción del fruto y todas sus partes, diversificando métodos con la finalidad de obtener

enzimas mediante procesos óptimos (**Abreu & De Figueiredo, 2019**). Los principales métodos para aislar enzimas de matrices vegetales son: mecánicos, enzimáticos y químicos. Los métodos mecánicos se fundamentan en la lisis celular, para ello se emplean molinos, que logran disminuir el tamaño de partículas por medio de martillos, cuchillas y, discos. También se suelen utilizar equipos de ultrasonido (**Khadhraoui et al., 2021**). Mientras que, los métodos enzimáticos, emplean cocteles constituidos de pectinasas, celulasas y alfa-amilasas, y se basan en la capacidad de las enzimas que catalizan la reacción por degradación de paredes celulares con lo que ayudan a liberar y extraer compuestos con alta selectividad y especificidad, siendo métodos amigables para el ambiente (**Colletti et al., 2021**).

Por otra parte, **Colletti et al., (2021)** señala que, los métodos químicos se fundamentan en separar compuestos e hidrolizar las paredes de las células. Dichos métodos usan solventes orgánicos, detergentes o álcalis para poder modificar las características de las paredes celulares y sus membranas. Por lo general son menos severos que los no mecánicos ya que, se puede purificar la enzima que se desee obtener (**Gul et al., 2021**). Dentro de ellos, se encuentran los métodos por precipitación que, emplean etanol al 60%, sulfato de amonio al 50% o acetona al 80%, que permiten la recuperación de la enzima de un 85% con un factor de purificación de 3-4,90 (**Abreu & De Figueiredo, 2019**).

#### **1.1.4.1. Conservación de la enzima**

Luego de extraer enzimas, es de suma importancia mantener su estabilidad y actividad proteolítica, por eso, se debe eliminar la humedad, evitando la aparición de microorganismos. Para lo cual, se puede aplicar procesos como el secado por estufa, atomización o por liofilización (**Nowak & Jakubczyk, 2020**). Siendo el más idóneo la liofilización ya que, permite almacenar y conservar por mayor tiempo a la muestra (**Nowak & Jakubczyk, 2020**). En relación a los otros procesos de secado que podrían desnaturalizar a la enzima especialmente por la aplicación de temperaturas elevadas (**Copeland, 2023**).

#### **1.1.4.2. Liofilización**

El proceso de liofilización es un método de secado, tiene la finalidad de separar el agua u otro solvente de una muestra, mediante tres etapas: congelación, sublimación del hielo a baja presión y desorción (Nowak & Jakubczyk, 2020). La liofilización se fundamenta en el fenómeno físico denominado sublimación del agua. Es decir, pasa a estado gaseoso sin ser transformado en su estado líquido (Sagar et al., 2020). En la congelación, ocurre la formación de hielo a temperatura menor a 0 ° C, mientras la velocidad de congelación sea más rápida, se tendrá cristales de hielo más pequeño dentro de la muestra. En la sublimación, los cristales de hielo son separados de la fase del soluto, aquí se elimina el vapor de agua teniendo la presión por debajo de la presión de vapor de la superficie del hielo, luego es extraído el vapor mediante la bomba de vacío y la condensación en los serpentines de refrigeración obteniendo una muestra seca (Oyinloye & Yoon, 2020; Silva-Espinoza et al., 2020).

#### **1.1.5. Cuantificación Proteica**

Para detectar o cuantificar la concentración de proteína existen diversos métodos que pueden ser cualitativos o cuantitativos tales como: ensayos de Biuret, Million, Ninhidrina, Dumas, Lowry, Bradford, Ácido Bicinónico, Kjeldahl, y entre otros (Fernández & Galván, n.d.).

##### **1.1.5.1. Método Kjeldahl**

Según Varelis, (2016) el método Kjeldahl es una prueba que puede llegar a cuantificar la concentración y/o porcentaje de proteína cruda presente en matrices alimentarias. Involucra tres fases: digestión, destilación y titulación. Su principio se basa en reaccionar al compuesto en presencia de catalizador y ácido sulfúrico permitiendo que el átomo de nitrógeno del compuesto orgánico nitrogenado se convierta en sulfato de amonio, este a la vez es destilado en medio alcalino absorbiéndose en ácido bórico, luego, por titulación, se determina el amoniaco con un ácido mineral estándar (Lim, 2018). Mide el contenido de nitrógeno, el

mismo que, se emplea para estimar el porcentaje de proteína mediante un factor de conversión. (Aguirre, 2022).

### **1.1.6. Actividad enzimática**

Se define a la actividad enzimática como la cantidad de enzima activa y presente en la muestra. Indica la velocidad de reacción que puede catalizar cierta enzima y es expresada como micromoles de sustrato que es transformado a producto en un minuto (Ganellin et al., 2018). La actividad de la bromelina se puede medir por medio de sustratos como: hemoglobina, tripéptidos, gelatina, cromogénicos y caseína, generando aminoácidos como la alanina, lisina y tirosina (Chakraborty et al., 2021). También puede darse la liberación de péptidos que son detectados por ensayos espectrofotométricos a un rango de longitud de onda entre 270 - 280 nm (Colletti et al., 2021).

#### **1.1.6.1. Ensayo espectrofotométrico**

BPS et al., (2022) menciona que, el ensayo espectrofotométrico se fundamenta en medir los cambios en la intensidad de luz absorbida o dispersada por la solución que se analiza, por lo general se emplean luz ultravioleta. La espectrofotometría es un método utilizado para cuantificar la luz que absorbe una sustancia atravesada por un haz (Gorog, 2018). Se fundamenta en absorber / transmitir luz por un compuesto en un determinado rango de longitud de onda. En análisis cuantitativos, conforme la muestra va absorbiendo radiación, disminuye la potencia del haz de luz incidente que llega al detector de fotones (Bhim Prasad, 2020).

## **1.1. Objetivos**

### **1.2.1. Objetivo general**

- Analizar la actividad enzimática de la bromelina obtenida a partir de residuos agroindustriales de la piña (*Ananas comosus*).

### **1.2.2. Objetivos específicos**

1. Extraer la bromelina a partir de residuos agroindustriales de la piña (*Ananas comosus*) (Cáscara y corazón).
2. Determinar el rendimiento de la bromelina obtenida a partir de residuos agroindustriales de la piña (*Ananas comosus*) (Cáscara y corazón).
3. Cuantificar la concentración proteica de la enzima obtenida a partir de residuos agroindustriales de la piña (*Ananas comosus*) (Cáscara y corazón).
4. Evaluar la actividad enzimática de la bromelina obtenida a partir de residuos agroindustriales de la piña (*Ananas comosus*) (Cáscara y corazón).

## CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA

### 2.1. Materiales

#### 2.1.1. Materiales

- Mascarillas
- Guantes de nitrilo
- Fundas herméticas (ziploc)
- Tijeras
- Ligas
- Cinta masking
- Cuchillo
- Cuchara
- Papel parafilm
- Papel aluminio
- Papel absorbente
- Jeringas
- Rotulador
- Gradilla
- Probetas 500, 100 ml
- Vasos de precipitación 250, 500 ml
- Balones de aforo
- Matraz Erlenmeyer
- Mortero y pistilo
- Recipientes herméticos
- Colador
- Tela liencillo
- Papel filtro
- Tubos falcón 15 ml
- Envases estériles para congelar muestras
- Envases ámbar
- Espátula
- Frascos de vidrio con tapa rosca azul
- Varilla de agitación
- Tubos de ensayo
- Micropipeta
- Puntas para micropipeta
- Tubos eppendorf
- Embudos

#### 2.1.2. Materia prima

- Piñas
- Residuos de piña (cáscara y corazón)

#### 2.1.3. Reactivos

- Etanol al 96%
- Caseína
- Fosfato difásico de sodio
- Monofosfato de sodio
- Ácido acético
- Agua destilada

#### **2.1.4 Equipos**

- Licuadora OSTER
- Balanza analítica Sartorius y VWR modelo 224AC
- Refrigeradora CEPCO e Indurama modelo RI - 470
- Congelador CEPCO
- Centrífuga GEMMY KKPLC
- Ultracongelador Binder
- Liofilizador BenchTop Pro
- Baño María WiseBath modelo WSB-18
- Plancha con agitación magnética VWR modelo 97042-682
- Sonicador BRANSON
- pH metro HANNA modelo 2221 y THERMO SCIENTIFIC modelo ORIONSTAR A211
- Espectrofotómetro Fisher Scientific modelo ACCUSKAN GO

#### **2.1.5. Recursos tecnológicos**

- ProQuest
- Scopus
- Elsevier
- PubMed
- ScieELO
- Google académico



## **2.2. Métodos**

### **2.2.1. Extracción de la bromelina a partir de residuos agroindustriales de la piña (*Ananas comosus*) (Cáscara y Corazón)**

Se aplicó el método de extracción líquido - líquido adaptado de **Gallardo et al., (2008)**. Por lo cual se realizó los siguientes pasos:

#### **2.2.1.1. Recolección de residuos de la piña (*Ananas comosus*) (Cáscara y Corazón)**

Se compró piñas en la sección frutas del Mercado Mayorista de la ciudad de Pelileo. Se retiró sus coronas, se lavó con abundante agua y se peló la cáscara. Se clasificó por separado su cáscara, corazón y pulpa, se pesó 1kg de cada muestra, las cuales, fueron colocadas en fundas herméticas y se almacenó en un congelador hasta su posterior preparación.

#### **2.2.1.2. Preparación de las muestras (Cáscara, corazón y control)**

La cáscara se lavó con agua potable y desinfectó con una solución de alcohol etílico al 70 %, se cortó en trozos de aproximadamente 2 cm<sup>2</sup> x 2 cm<sup>2</sup>, se colocó en una licuadora y trituró hasta obtener un material homogéneo, que se colocó en recipientes herméticos, tapados, rotulados y almacenados a temperatura ambiente. Para las muestras del corazón y el control (pulpa), se cortó trozos de 2 cm<sup>3</sup> x 2 cm<sup>3</sup>, se trituraron por separado y se obtuvieron muestras homogeneizadas. El volumen final de los homogeneizados obtenidos de cada una de las muestras fue de 1000 ml.

### **2.2.1.3. Precipitación del extracto de jugo con etanol**

Para precipitar la enzima se empleó como solvente orgánico etanol al 96 %. Para cada muestra por separado, se tomó el extracto licuado y añadió etanol en proporción 1:1.5 (extracto: etanol), se colocó en recipientes herméticos con tapas y se dejó en un congelador a -10 ° C por 7 días.

### **2.2.1.4. Separación del extracto de bromelina**

Para separar el extracto de bromelina del solvente, se filtró la mezcla obtenida en la etapa anterior con la ayuda de un colador y tela liencillo permitiendo la separación de los restos sólidos de mayor tamaño. El líquido filtrado se colocó en un recipiente cerrado y en reposo a temperatura ambiente durante 6 horas para sedimentar las muestras. Se colocó en tubos falcón de 15 ml y centrifugó a 4500 rpm durante 16 minutos, para obtener un sobrenadante y precipitado. El precipitado fue recolectado en un envase estéril. El sobrenadante fue centrifugado nuevamente, permitiendo la recuperación de sólidos. Finalmente, se realizó una filtración del precipitado para eliminar las trazas de etanol. Las muestras del extracto de la bromelina obtenida, se almacenó en un congelador durante 8 días.

### **2.2.2. Determinación del rendimiento de la bromelina obtenida a partir de residuos agroindustriales de la piña (*Ananas comosus*) (Cáscara y corazón)**

El rendimiento fue calculado para cada muestra. Para ello, se aplicó el método adaptado de **Bermeo et al., (2020)**. Primero se registró el volumen de las muestras del extracto de la bromelina obtenida y su peso. Se colocó las muestras a -75 °C en el ultracongelador durante 12 días. Posteriormente, las muestras fueron liofilizadas a -40 °C utilizando las condiciones detalladas por el fabricante del equipo, se obtuvo la enzima en polvo

previamente triturada. Se registró el peso de cada una de las muestras liofilizadas, se colocaron en fundas herméticas y envases ámbar y se almacenó en refrigeración para la conservación de la enzima. Dichos valores permitieron calcular el rendimiento de la enzima en polvo obtenida, aplicando la ecuación establecida por **Dali et al., (2022)**:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Masa de la muestra seca (g)}}{\text{Extracto de la bromelina}} \times 100$$

Ecuación (1)

### **2.2.3. Cuantificación de la concentración proteica de la enzima obtenida a partir de residuos agroindustriales de la piña (*Ananas comosus*) (Cáscara y corazón)**

Para cada muestra de bromelina en polvo se aplicó el método adaptado de (**AOAC 2001.11, 2003**). Para ello, se empleó el método de digestión Kjeldahl detallado en la norma AOAC Ed. 21, 2019. Primero se realizó una digestión, se pesó un gramo de muestra y se colocó en los tubos de digestión, añadiendo una tableta de catalizador Kjeldahl y 15 ml de ácido sulfúrico. Los tubos de digestión con las muestras fueron colocados en el módulo digestor y se realizó la digestión a 420 °C durante 60 minutos.

Una vez enfriada la muestra, se colocó 70 ml de agua destilada en cada tubo, por otra parte, se colocaron en un matraz Erlenmeyer 30 ml de ácido bórico. Seguidamente se hizo una neutralización por destilación, para ello, se ubicó el tubo que contenía la muestra digerida y el matraz Erlenmeyer en el módulo destilador, se dosificó 50 ml de hidróxido de sodio y se destiló. Finalmente, se realizó una valoración con ácido clorhídrico 0.1 N, hasta que la solución presentó un viraje verde violeta. Se registró el volumen del ácido

clorhídrico consumido en la valoración, dichos valores permitieron calcular el porcentaje de nitrógeno y, a su vez, el porcentaje de proteína presente en cada muestra.

### 2.2.3.1. Cálculo del porcentaje de proteína presente en la muestra

Se aplicó las siguientes ecuaciones:

$$(\%) \text{Nitrógeno} = \left( \frac{\text{HCl}_{\text{ml}} \times \text{N}_{\text{HCl}}}{W_{\text{muestra}}} \times 0,014 \right) \times 100$$

Ecuación (2)

$$(\%) \text{Proteína} = (\%) \text{Nitrógeno} \times F$$

Ecuación (3)

Donde:

$\text{HCl}_{\text{ml}}$  : Volumen consumido de ácido clorhídrico en mililitros.

$\text{N}_{\text{HCl}}$  : Normalidad del ácido clorhídrico.

$W_{\text{muestra}}$  : Peso de la muestra en gramos.

F: Factor de conversión de nitrógeno a proteína de la muestra (6.25).

#### **2.2.4. Evaluación de la actividad enzimática de la bromelina obtenida a partir de residuos agroindustriales de la piña (*Ananas comosus*) (Cáscara y corazón).**

Se aplicó la metodología adaptada de **Clavijo et al., (2012)**. Primero, se preparó las siguientes soluciones: solución acuosa de la enzima extraída (1% p/v), solución acuosa de caseína al 2% en peso, solución de ácido acético 1M y solución de buffer fosfato 0.1 M pH 6. Cada solución, se calentó en un baño maría a 30 °C por 10 minutos. Para una adecuada preparación de las soluciones de enzimas y sustrato, fue necesario aplicar un baño ultrasónico y/o agitación magnética para asegurar un resultado reproducible y se determinó la actividad enzimática para cada tratamiento.

Se realizó 8 mezclas de las soluciones de enzima y sustrato (3 ml cada una) en presencia de buffer (1.5 ml), se añadió 3ml de la solución de ácido acético 1M para detener la reacción en un lapso de 30 segundos en cada mezcla (total 4 minutos). Para la medición de la absorbancia se empleó como blanco una mezcla de caseína (3 ml) y buffer (1.5ml). Las medidas se realizaron a 270 nanómetros (nm) en un espectrofotómetro y se midió cada muestra por triplicado.

Una vez obtenidos los datos, se realizó la gráfica para obtener la pendiente de la recta, y a partir de dicho valor se calculó la actividad enzimática total y específica aplicando las ecuaciones indicadas en Vega, (2017) adaptada de **Clavijo et al., (2012)** y mostradas a continuación:

Ecuación para el cálculo de la actividad enzimática total:

$$AE = \left( \frac{\frac{\Delta A}{t \times 60} \times \phi}{\times L \times PM_{\text{caseína}}} \times 10^6 \right) (\mu\text{mol/ min. ml})$$

Ecuación (4)

Donde:

AE: Actividad enzimática total.

$\frac{\Delta A}{t}$ : Diferencia de la actividad enzimática de la bromelina extraída.

$\phi$ : Factor de dilución (10)

$\varepsilon$ : Coeficiente de extinción (10.1)  $\left( \frac{\text{g}}{100\text{ml}} \right)^{-1} (\text{cm})^{-1}$ .

L: longitud atravesada por la luz (cm).

PM caseína: Peso molecular de la caseína (g/mol).

Ecuación para el cálculo de la actividad enzimática específica:

$$AEe = \left( \frac{AE}{[\text{prot}]} \times 10^{-6} \right) (\text{mol/ min. mg})$$

Ecuación (5)

Donde:

AEe: Actividad enzimática específica.

AE: Actividad enzimática total ( $\mu\text{mol/ min ml}$ ).

[Prot]: Concentración de proteína (mg/ml).

$$[\text{Prot}] = \left( \frac{(\%) \text{Proteína} \times \text{enzima (g)}}{\text{muestra (ml)}} \times 10^3 \right)$$

Ecuación (6)

En donde:

[prot]: Concentración de proteína (mg/ml).

(%)Proteína: Porcentaje de proteína obtenida de la muestra

Enzima (g): la cantidad de muestra de enzima que se añadió.

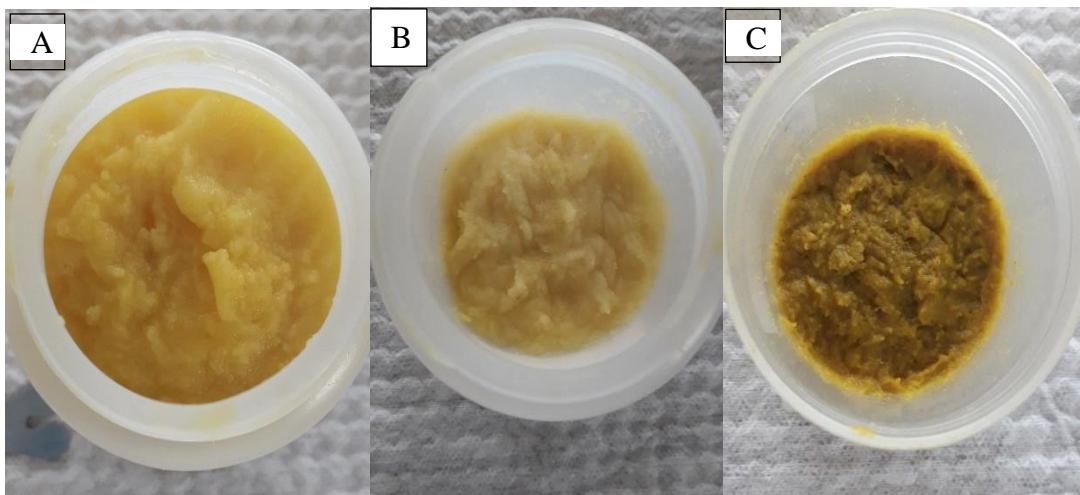
Muestra: Volumen total de la solución (ml).

## CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Análisis y discusión de resultados

#### 3.1.1. Obtención del extracto enzimático

A continuación, se presentan los extractos obtenidos luego de la precipitación alcohólica de la enzima a partir de las muestras de residuos de piña. En donde, las características como el color, la textura y el volumen de los extractos variaron según el tipo de residuo. En las **Figuras 3 y 4** se muestran las diferencias respectivamente.



**Figura 3.** Extractos enzimáticos obtenidos. **A:** Muestra obtenida a partir de la pulpa. **B:** Muestra obtenida del corazón. **C:** Muestra de la cáscara de piña.

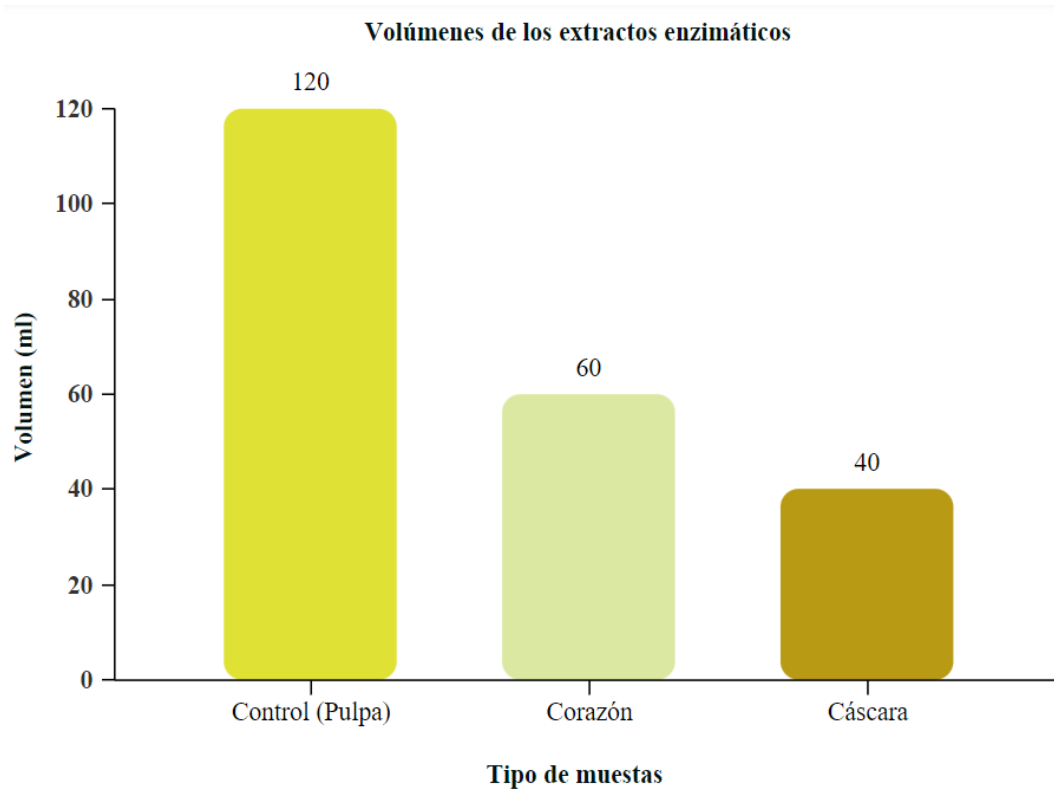
Como se observa en la **Figura 3**, el color de cada extracto fue distinto y puede atribuirse a las características de la muestra, debido a los carotenoides presentes en cada una, ya que, son los pigmentos responsables del color del fruto. La violaxantina y varios ésteres de (9Z)-violaxantina son carotenoides que se encuentran en la piña y le confieren el color a la pulpa. Mientras que, la cáscara puede presentar pigmentos del cloroplasto como violaxantina, neoxantina, leuteína y  $\beta$ -caroteno otorgando el color característico (Steingass et al., 2020). Sin embargo, el extracto enzimático del corazón tuvo un color



amarillo más pálido en comparación con el de la pulpa, lo que, puede deberse a la concentración baja de carotenoides que presenta el corazón (**Vollmer et al., 2020**).

Otro factor observado fue la textura, ya que, luego de la homogenización, la muestra de la pulpa tenía una textura suave, jugosa y poca fibrosa. Mientras que, la muestra del corazón presentó una textura más fibrosa. A diferencia de la cáscara que, presentó una textura más dura. La variación es, debido a, la composición de cada parte de la piña, a sus partículas sólidas, líquidas, el tamaño, la forma y la concentración de las moléculas que lo conforman (**Damodaran & Parkin, 2018**) . Así como también, sus restos sólidos y bagazos, por la composición química y física diferente. Tal es el caso de la cáscara y el corazón que contienen mayor cantidad de fibra en comparación con la pulpa. Es así que, el 76% de los subproductos de piña contienen 99, 2% de fibra insoluble y 3, 1% de fibra cruda siendo la cáscara de piña buena fuente de fibra la que le confiere una textura fibrosa por las cantidades considerables de celulosa y lignina que presenta **Bravo-Solórzano et al., (2022)**.

También, el volumen del extracto de bromelina obtenido del corazón fue mayor al de la cáscara, como se visualiza en la **Figura 4**. A pesar de, haber aplicado igual metodología y solvente en misma proporción, el de la muestra control superó a las dos variables en estudio. Dicha variación, puede atribuirse a que, cada parte de la fruta contiene una concentración diferente de bromelina, por ende, su volumen va a variar (**Benefo & Ofosu, 2018**).



**Figura 4.** Volúmenes de los extractos enzimáticos obtenidos

Los volúmenes de los extractos obtenidos a partir de 1000 ml de muestras homogeneizadas, son mayores en comparación con los que se reporta en **Clavijo et al., (2012)** quienes obtuvieron por cada 100 ml de extracto de pulpa de piña 1, 782 mg/ml y 1, 460 mg/ml de precipitado al haber empleado solvente etanol a concentraciones de 75 % y 50% respectivamente, sugiriendo que la concentración de etanol es un factor que influenció en la cantidad de enzima extraída (**Banerjee et al., 2020**). También, un método de extracción diferente y otro tipo de solvente puede variar dicha característica. Por ello, **Ortigoza-Rodríguez et al., (2020)** en su estudio usaron buffer fosfato de potasio y obtuvieron a partir de 33 gramos de cáscara 38, 33 ml de extracto crudo y un rendimiento de 1, 16 ml/g, siendo, un valor mejor al obtenido en este estudio.

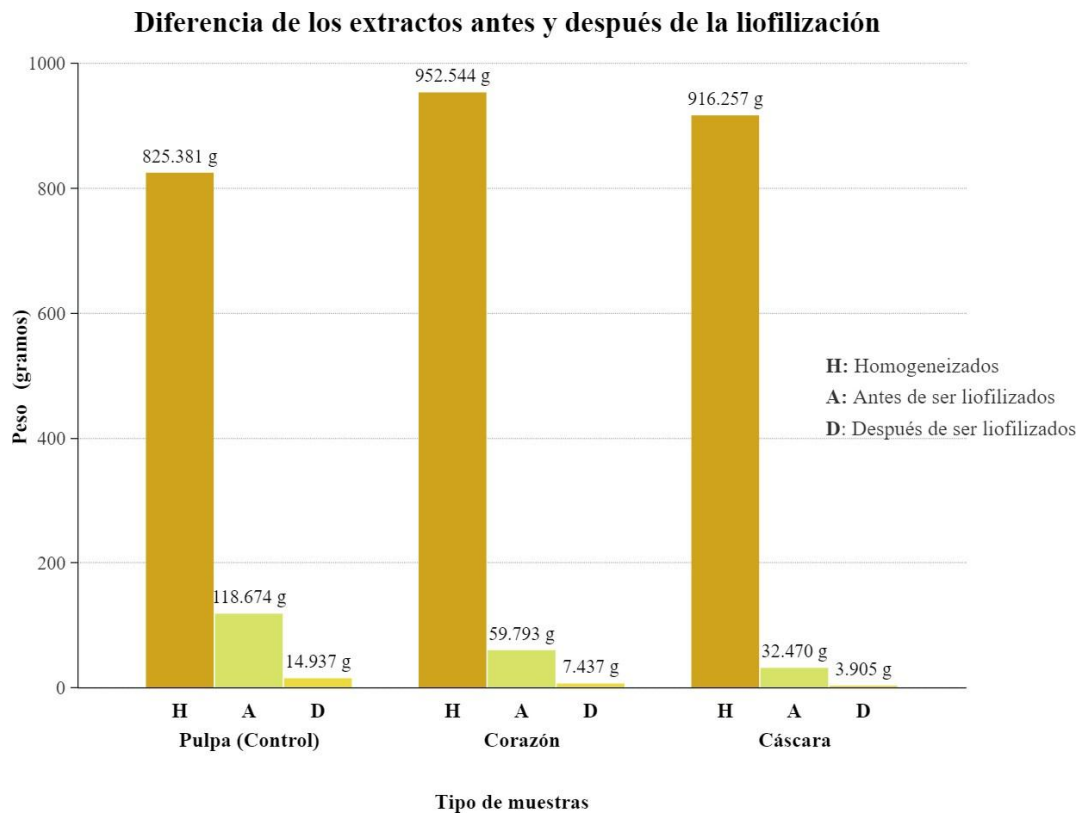
Es importante destacar que, el solvente etanol empleado para la precipitación de la enzima interfirió en las interacciones hidrofóbicas al interior de las proteínas globulares, evitando el daño de enlaces covalentes de las cadenas peptídicas (Nyi M Saptarini et al., 2019). Además, las condiciones de tiempo y temperatura de almacenamiento de las muestras permitieron una adecuada precipitación de la enzima, ya que al aumentar la temperatura las proteínas pueden llegar a desnaturalizarse (Díaz Fernández, 2021). Adicionalmente al método de extracción o solvente, la temperatura también debe ser considerada ya que, a bajas temperaturas se evita la desnaturalización debido a la poca flexibilidad de las biomoléculas, reduciendo así la penetración del solvente y a su vez, disminuyendo la pérdida de actividad de las enzimas (Abreu & De Figueiredo, 2019).

### 3.1.2. Determinación del rendimiento del extracto enzimático obtenido

En la **Tabla 6** se presenta el peso y el rendimiento de las muestras una vez liofilizadas. Además, En la **Figura 5** se representa la diferencia de los extractos antes y después del proceso de secado en relación al peso de los homogeneizados obtenidos inicialmente.

**Tabla 6.** Peso y rendimiento del extracto enzimático liofilizado

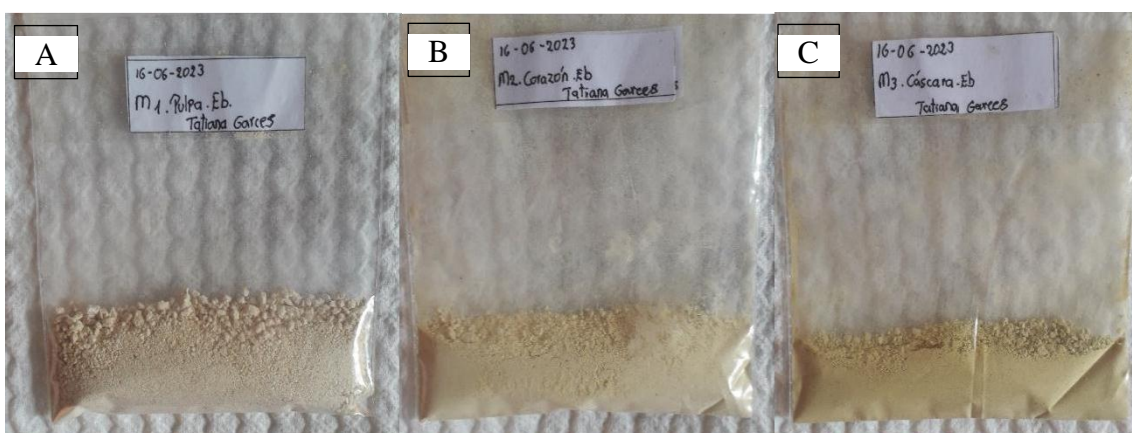
N°	Muestra	Peso (gramos)	Rendimiento %
0	Pulpa (control)	14,937	1,810
1	Corazón	7,437	0,781
2	Cáscara	3,905	0,426



**Figura 5.** Diferencia de los extractos enzimáticos antes y después de la liofilización

El tiempo que tardó en liofilizar cada muestra fue distinto. Como se puede analizar en la **Figura 5**, la de la cáscara que contenía menor peso tardó 24 horas. Mientras que, la muestra del corazón requirió de 48 horas. A diferencia, de la muestra control, que, al contener mayor peso, necesitó 72 horas para eliminar completamente la humedad. Principalmente, se debe a la cantidad de agua que contiene cada parte, la cual, si es mayor tardará más tiempo para que la muestra quede seca (**Hernández Ramírez et al., 2021**). Por lo que, la muestra de la pulpa al contener mayor cantidad de agua en relación al corazón y a la cáscara se demoró más tiempo. Por otra parte, el rendimiento del extracto enzimático luego de la liofilización en relación al peso del homogeneizado con el que se trabajó, fue bajo. No obstante, la muestra del corazón de la piña alcanzó el mayor rendimiento en comparación a la de la cáscara, pero la muestra control fue la que superó el rendimiento total (**Tabla 6**).

**Bermeo et al., (2020)** encontraron que el rendimiento enzimático de la bromelina es de 0.75 g por cada kilogramo de cáscara de piña y puede estar influenciado por el cultivo y factores genéticos del fruto, además por el método de extracción. Pero en muestras liofilizadas tanto su rendimiento como el tiempo de secado está directamente influenciado por el volumen y el peso de la muestra a secar, debido a la tasa de sublimación que afecta a la estructura celular creando restricciones en el coeficiente de transferencia de masa provocando así, la reducción de la tasa de deshidratación (**Oyinloye & Yoon, 2020**).



**Figura 6.** Bromelina Liofilizada. **A:** Muestra de la pulpa. **B:** Muestra del corazón.  
**C:** Muestra de la cáscara.

Con respecto a las características sensoriales de las muestras en polvo, destacaron su color, olor y apariencia. Como se observa en la **Figura 6**, el cambio de color, pudo deberse a la exposición de las muestras a la luz durante la liofilización ya que, puede afectar a los grupos cromóforos de la enzima, incluso, reacciones químicas entre la enzima y otros componentes como los pigmentos pudieron haber influenciado en su coloración (**Duarte Castillo et al., 2023**). En cuanto a su olor, fue posible percibir aromas más concentrados, propios de la piña en relación al extracto húmedo, evidenciando que, la liofilización contribuye a retener los olores característicos del fruto. Por otro lado, su apariencia, presentó una textura dura y compacta, por lo que, fue necesario triturar hasta obtener la muestra en polvo.

**Surco Laos et al., (2017)** en su estudio liofilizaron pulpa de mango en donde, se evidenció el efecto en el contenido de carotenoides con pérdidas de 40.9% de color del mango liofilizado. Lo que coincide con el estudio realizado debido a que si existieron pérdidas de color en las muestras de enzimas liofilizadas, dejando un color amarillo pálido en la muestra de bromelina de la pulpa. Mientras que el olor, se conservó lo que, concuerda con **Ramírez-Navas, (n.d.)** quien señala que un alimento al ser sometido al proceso de liofilización tienen un mínimo encogimiento, sus aromas, sabores y texturas no se pierden si no que, lo intensifican además, sus características nutricionales se mantienen. Entonces, la liofilización no cambió las estructuras físico-químicas del producto y permitió la conservación indefinida sin cadena de frío.

### 3.1.3. Cuantificación proteica del extracto obtenido

A continuación se presentan los porcentajes de proteína presentes en cada muestra analizada con el método AOAC Ed 21.2019 2001.11.

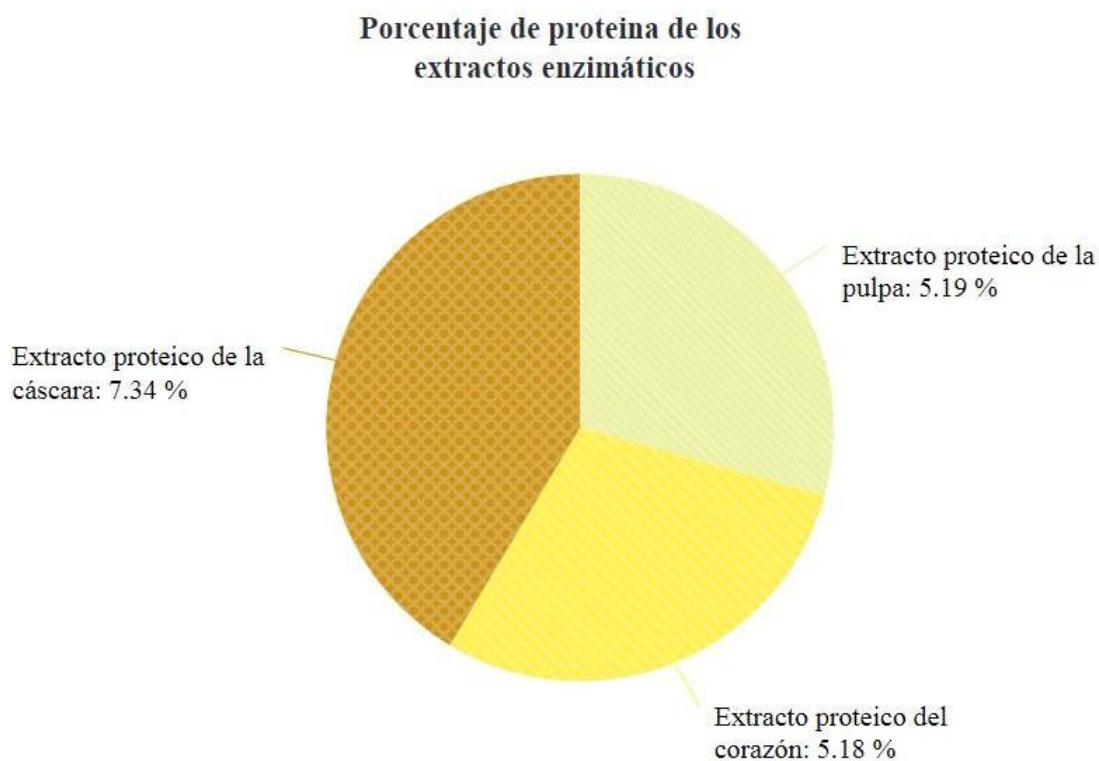
**Tabla 7.** Contenido de proteína en las muestras

Nº	Muestra	% Proteína
0	Pulpa (control)	5,19
1	Corazón	5,18
2	Cáscara	7,34

**Fuente:** LACONAL, 2023.

Como es notable en la **Tabla 7**, el mayor porcentaje de proteína se concentró en la bromelina de la cáscara, mientras que, la del corazón difiere en 0, 01 % en relación a la de la pulpa. Pero, al considerarse proteína cruda indica que no todo el contenido de nitrógeno está en forma de proteína, debido a que, puede presentarse en diferentes

moléculas o compuestos como en los ácidos nucleicos, aminos, o urea (Zhou et al., 2021).



**Figura 7.** Porcentaje de proteína presente

Como se evidencia en la **Figura 7**, el porcentaje de proteína de muestra obtenida de la cáscara de piña supera a la muestra del corazón. Y al comparar bibliográficamente, el contenido de proteína en la cáscara de piña está entre el 10 al 30% (Zhou et al., 2021). Pero luego de ser sometido a proceso de secado sea por aspersion, liofilización o entre otros, dicho contenido presenta una disminución que puede encontrarse entre el 6 a 8% de proteína bruta (Idayanti et al., 2022). Lo que concuerda con los resultados obtenidos ya que el porcentaje de proteína de la cáscara se encuentra en un rango medio luego de

haber pasado por un proceso de liofilización. Sin embargo, los porcentajes obtenidos son diferentes a lo que encontró **Aruna, (2019)** quien señala que, la cáscara de piña sin fermentar contiene 4, 5% de proteína cruda pero comprobó que al ser sometidas a fermentación en estado sólido se incrementó el rendimiento de proteína cruda a 14, 9%. Entonces, el tipo de metodología y/o tratamiento que se aplique es uno de los factores que ocasiona la variación de los porcentajes de proteína de una misma matriz en estudio.

**Santos et al., (2021)** aplicaron presión hidrostática a muestras de cáscara y corazón de piña y liofilizaron obteniendo un polvo estable con un porcentaje de proteína menor (3, 86 %) pero, este fue mayor al del corazón (2, 71%). Dichos valores son bajos en relación con los obtenidos en este estudio, pero, se pudo comparar que el contenido de proteína de la cáscara si es mayor a la del corazón, considerando que la muestra obtenida fue un concentrado de bromelina a diferencia de los estudios que han realizado directamente con la cáscara o el corazón del fruto.

#### **3.1.4. Determinación de la actividad enzimática de la bromelina**

En la **Tabla 8** se presenta los resultados obtenidos de la actividad enzimática total y específica de la bromelina de residuos de la piña correspondiente a cada muestra estudiada que fueron calculadas a partir de los valores de absorbancia medidos y su variación analizada a partir del cálculo por regresión lineal (**Anexo 6**) en función del tiempo en que el sustrato fue catalizado por la enzima bajo condiciones de pH y temperatura para su activación.

En la preparación de soluciones de las enzimas y el sustrato, no se logró disolver completamente cada una, por lo que, fue necesario aplicar un tratamiento con baño ultrasónico y otro con agitación magnética para una homogeneización adecuada.



**Tabla 8.** Resultados de la actividad enzimática de las muestras de bromelina

Muestras	Actividad Enzimática			
	Baño Ultrasónico		Agitación magnética	
	Total ( $\mu\text{mol}/\text{min.ml}$ )	Específica ( $\text{mol}/\text{min.mg}$ )	Total ( $\mu\text{mol}/\text{min.ml}$ )	Específica ( $\text{mol}/\text{min.mg}$ )
Pulpa	96,994	$1,87 \times 10^{-4}$	48,497	$9,34 \times 10^{-5}$
Corazón	169,740	$3,28 \times 10^{-4}$	96,994	$1,87 \times 10^{-4}$
Cáscara	72,746	$9,91 \times 10^{-5}$	24,249	$3,30 \times 10^{-5}$

Los valores de absorbancia (**Tabla 10**) indican la variación del producto generado que fue tirosina por la degradación de caseína como sustrato, el cual, se pudo determinar mediante espectrofotometría por el residuo aromático que generó (**N. M. Saptarini et al., 2019**). Se analizó, que, la actividad enzimática, presentó valores diferentes, siendo mayor la obtenida del corazón de la piña. Pero al tomar en cuenta sus efectos por el proceso liofilización, se consideran resultados favorables que, podrían ser mejorados al reajustar sus condiciones de pH, temperatura y concentración. También, se observó que, es posible que, el tipo de tratamiento empleado para homogeneizar la soluciones, pueden afectar directamente a la actividad de la enzima. Como es notable (**Tabla 8**) las soluciones que fueron tratadas con baño ultrasónico presentaron mayor actividad en comparación con las que fueron analizadas con agitación magnética. Sin embargo, al no haber realizado réplicas de cada cálculo no se pudo comparar estadísticamente si existieron o no diferencias significativas entre ambos tratamientos.

Los valores de actividad enzimática de la cáscara y la pulpa obtenidos son bajos en relación con los reportados por **N. M. Saptarini et al., (2019)** quienes emplearon el mismo sustrato, obteniendo valores de actividad enzimática de 7, 72 UI/mg  $\pm$  0, 45 UI/mg

siendo mayor a la actividad de la fruta (4, 71 UI/mg). Mientras que, **Rocha et al., (2019)** en su estudio evaluaron la actividad enzimática de un extracto de bromelina de la cáscara de piña y sus efectos cicatrizantes en ratas, su actividad proteolítica fue de 1, 30 U mg<sup>-1</sup> y la específica de  $45 \times 10^{-3}$  U μg<sup>-1</sup>, también, compararon con bromelina comercial (1, 04 mg<sup>-1</sup>), la conclusión final fue que la enzima de residuos del fruto presenta actividad proteolítica superior. Los resultados son diferentes a los obtenidos en la presente investigación, esto puede deberse a la utilización de diferente sustrato, condiciones óptimas como pH, temperatura y concentración ya que, en comparación con **Rocha et al., (2019)**, emplearon albúmina como sustrato. Entonces, depende de las muestras y la metodología diferente de cada caso. Incluso, la variación de actividad pudo estar influenciada por las partes de la planta y el fruto debido a que, el contenido de agua de la corona es menor que la del fruto. También, el sitio de su desarrollo afecta el contenido de bromelina (**N. M. Saptarini et al., 2019**). Además, la actividad de bromelina juntamente con su concentración dependen de la variedad de la piña la parte de la cual se obtiene, por sus condiciones de crecimiento como el clima o el tipo de suelo en la que se desarrolló la planta (**Benefo & Ofosu, 2018**).

Mientras que, la actividad enzimática del corazón fue mayor a la de la cáscara y la pulpa. Resultados que se asemejan a los obtenidos por **Santos et al., (2022)** quienes encontraron que, la actividad enzimática del corazón con un aumento del 350 % es mayor que el de la cáscara con un incremento de 134% al haber aplicado presión hidrostática de 200 a 250 MPa. Pese a que, **Santos et al., (2021)** obtuvieron resultados contrarios, donde, la cáscara (17, 73 – 19, 90 mg tirosina. min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup>) presentó mayor actividad de la bromelina en comparación con el corazón (7, 14 – 9, 45 mg tirosina. min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup>). **Ponce & Barba, (2018)** señalan que, la actividad de las enzimas pueden ser afectadas por su peso mientras mayor sea, mejor actividad enzimática tendrá. Sin embargo, la actividad enzimática de la pulpa fue menor, esta desigualdad puede estar relacionada también con la concentración entre enzima y sustrato ya que, la enzima puede saturarse si la concentración de la caseína es mayor que la de la solución de bromelina (**Clavijo et al., 2012**)

Finalmente, la actividad enzimática estuvo influenciada por el tratamiento que se aplicó para la preparación de las soluciones y pudo deberse a que, el baño ultrasónico favorece a que una disolución sea eficaz y rápida debido a la agitación mecánica y sus efectos de cavitación que causan al ingresar ondas ultrasónicas en los líquidos, esta entrada de energía acelera y facilita el pretratamiento de las muestras antes de sus respectivos análisis **(Hielscher, 2023)**. Es así que, **Abadía-García et al., (2021)** demostraron que, el tratamiento aplicando ultrasonido previo a una hidrólisis enzimática es una estrategia innovadora que permite modificar el perfil peptídico de hidrolizados y así mejoran su producción. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que, al someter por un prolongado tiempo una muestra a ultrasonido de altas intensidades puede inhibir la acción de ciertas enzimas y ser desnaturalizadas por efectos de la cavitación **(Parzanese, n.d.)**. A diferencia, de la aplicación de agitación magnética o manual que tarda mayor tiempo, no permite una buena homogeneización o dilución por lo que se considera ineficaz **(Hielscher, 2023)**.

## CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 4.1. Conclusiones

- Los extractos de bromelina se lograron extraer de la cáscara y del corazón de la piña, cada una de las muestras presentaron diferentes cantidades y características en peso, volumen y color. Por lo que, el método de extracción líquido - líquido con etanol al 96% puede ser uno de los más adecuados para extraer enzimas con mayor cantidad del corazón de la piña.
- El rendimiento de la enzima fue bajo, considerando el alto contenido de agua y otros componentes que presenta el fruto de piña. Destacando, la del corazón con el 0,78 %, pero, el rendimiento de la muestra control fue superior (1,81 %), además, de sus buenas características sensoriales, como el olor y el color.
- La cáscara de la piña presentó mayor contenido de proteína (7,3 %) en el extracto en polvo obtenido de dicho residuo, constituyendo una buena fuente para la extracción de enzima.
- La bromelina en polvo del corazón presentó mejor actividad enzimática. Con mayor contenido las analizadas a partir de, las soluciones con baño ultrasónico: Total (169,740  $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{ml}$ ) y específica ( $3,28 \times 10^{-4}$  mol/min. mg). Y las evaluadas con agitación magnética: Total (96,994  $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{ml}$ ) y específica ( $1,87 \times 10^{-4}$  mol/min. mg).

## 4.2. Recomendaciones

- Llevar a cabo ensayos en donde se combine la bromelina de la cáscara con la del corazón para compensar su contenido de proteína, además, probar diferente pH, temperatura y concentración para encontrar un rango óptimo con la finalidad de mejorar la actividad enzimática.
- Estudiar la estabilidad de la bromelina en polvo con respecto a su actividad enzimática en relación a su tiempo de vida útil.
- Incorporar la bromelina en un producto alimentario con el fin de conferirle características funcionales y comprobar su efectividad mediante un estudio in vitro.
- Evaluar la actividad de la enzima aplicando réplicas en el cálculo, con la finalidad de comparar estadísticamente diferencias significativas entre los tratamientos utilizados.

## C. MATERIAL DE REFERENCIA

### Referencias bibliográficas

- Abadía-García, L., Castaño-Tostado, E., Cardador-Martínez, A., Martín-Del-campo, S. T., & Amaya-Llano, S. L. (2021). Production of ACE inhibitory peptides from whey proteins modified by high intensity ultrasound using bromelain. *Foods*, *10*(9). <https://doi.org/10.3390/foods10092099>
- Abbas, S., Shanbhag, T., & Kothare, A. (2021). Applications of bromelain from pineapple waste towards acne. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *28*(1), 1001–1009. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.032>
- Abreu, D. C. A., & De Figueiredo, K. C. S. (2019). Bromelain separation and purification processes from pineapple extract. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, *36*(2), 1029–1039. <https://doi.org/dx.doi.org/10.1590/0104-6632.20190362s20180417>
- Agrawal, P., Nikhade, P., Patel, A., Mankar, N., & Sedani, S. (2022). Bromelain: A Potent Phytomedicine. *Cureus*, *14*(8). <https://doi.org/10.7759/cureus.27876>
- Agrihortico CPL. (2021). *Pineapples: Growing Practices and Nutritional Information* (AGRIHORTICO (ed.)).
- Aguiar Novillo, S., Enríquez Estrella, M., & Uvidia Cabadiana, H. (2022). Residuos agroindustriales: su impacto, manejo y aprovechamiento. *Revista Científica de Investigación , Docencia y Proyección Social*, *27*, 05–10. <https://doi.org/https://doi.org/10.26621/ra.v1i27.803>
- Aguirre, J. (2022). *The Kjeldahl Method: 140 Years*. Jaime Aguirre.
- Aili Hamzah, A. F. ., Hamzah, M.H.; Che Man, H. ., & Jamali, N.S.; Siajam, S.I.; Ismail, M. H. (2021). Recent Updates on the Conversion of Pineapple Waste (Ananas comosus) to Value-Added Products, Future Perspectives and Challenges. *Agronomy*, *11*(2221). <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/agronomy11112221>

- AOAC 2001.11. (2003). Official Methods of Analysis (Volume 1). *Chemical and Functional Properties of Food Saccharides*, 1(Volume 1), 73–80. <https://doi.org/10.7312/seir17116-004>
- Aruna, T. E. (2019). Production of value-added product from pineapple peels using solid state fermentation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 57(102193), 6. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102193>
- Badui Dergal, S. (2020). Enzimas. In M. Quirasco Baruch, A. López, & M. Canales (Eds.), *Química de los Alimentos* (6th ed., p. 65).
- Banerjee, S., Arora, A., Vijayaraghavan, R., & Patti, A. F. (2020). Extraction and crosslinking of bromelain aggregates for improved stability and reusability from pineapple processing waste. *International Journal of Biological Macromolecules*, 158(September), 318–326. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.220>
- Barrera, R., Ardila, A. N., & Murcia, J. F. (2020). Producción de etanol a partir de piñas de rechazo de cultivos del Chocó. *Revista ION*, 33(1), 47–56. <https://doi.org/https://doi.org/10.18273/revion.v33n1-2020005>
- Benefo, E. O., & Oforu, I. W. (2018). Bromelain Activity of Waste Parts of Two Pineapple Varieties. *Sustainable Food Production*, 2, 21–28. <https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/sfp.2.21>
- Bermeo, J. G., Tello, I. P. S., Mancheno, C. I. F., & Herrera, T. E. S. (2020). Evaluación da la actividad de tres enzimas proteolíticas como biocatalizadores lácteos. *ConcienciaDigital*, 3(2.1), 162–176. <https://doi.org/10.33262/concienciadigital.v3i2.1.1231>
- Bhim Prasad, K. (2020). *Chemical Analysis and Material Characterization by Spectrophotometry* (K. Eryilmaz (ed.)). Susan Dennis.
- Bottega, R., Persico, I., De Seta, F., Romano, F., & Di Lorenzo, G. (2021). Anti-inflammatory properties of a proprietary bromelain extract (Bromeyal<sup>TM</sup>) after in vitro simulated gastrointestinal digestion. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 35. <https://doi.org/10.1177/20587384211034686>
- BPS, B. S. A. M., American Association for Research, & Pegsboston. (2022).

- Spectrophotometric Enzyme Assays. *Creative Enzymes*. [https://www.creative-enzymes.com/resource/spectrophotometric-enzyme-assays\\_5.html](https://www.creative-enzymes.com/resource/spectrophotometric-enzyme-assays_5.html)
- BPS, B. S. A. M., American Association for Research, Pegsboston, & Organization, B. I. (2014). *Enzymes for Research, Diagnostic and Industrial Use*. [https://www.creative-enzymes.com/similar/bromelain\\_90.html](https://www.creative-enzymes.com/similar/bromelain_90.html)
- Bravo-Solórzano, R., Moreira-Mendoza, H., & Gavilanes-López, P. (2022). Formulation of a nutritious hydrating drink from banana pseudostem juice and pineapple peel macerate. *Chemical Technology*, 42.
- Camacho Gómez, M. (2018). *Managerial Competencies of agro-industrial entrepreneurs*. <https://doi.org/https://doi.org/10.14482/pege.44.10528>
- Cannon, R. J., & Ho, C. T. (2018). Volatile sulfur compounds in tropical fruits. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(2), 445–468. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.01.014>.
- Chakraborty, A. J., Mitra, S., Tallei, T. E., Tareq, A. M., Nainu, F., Cicia, D., Dhama, K., Emran, T. Bin, Simal-Gandara, J., & Capasso, R. (2021). Bromelain a potential bioactive compound: A comprehensive overview from a pharmacological perspective. *Life*, 11(4), 317. <https://doi.org/10.3390/life11040317>
- Chaudhary, V., Kumar, V., Sunil, Vaishali, Singh, K., Kumar, R., & Kumar, V. (2019). Pineapple (*Ananas cosmosus*) product processing: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(3), 4642–4645. [www.phytojournal.com](http://www.phytojournal.com)
- Clavijo, D., Portilla, M., & Quijano, A. (2012). Cinética de la bromelina obtenida a partir de la piña perolera ( *Ananas Cosmosus* ) de Lebrija-Santander. *Revista de La Facultad de Ciencias Básicas*, 10(2), 41–49.
- Colletti, A., Li, S., Marengo, M., Adinolfi, S., & Cravotto, G. (2021). Recent Advances and Insights into Bromelain Processing, Pharmacokinetics and Therapeutic Uses. *Applied Sciences*, 11(8428), 20. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/app11188428>
- Copeland, R. A. (2023). *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis* (J. W. & Sons (ed.)).
- Cortez, F., & Ligabue-Braun, R. (2021). Agro-Industrial Residues: Eco-Friendly and



- Inexpensive Substrates for Microbial Pigments Production. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.589414>
- Dali, I., Aydi, A., Stamenic, M., Kolsi, L., Ghachem, K., Zizovic, I., Manef, A., & Delgado, D. R. (2022). Extraction of lyophilized olive mill wastewater using supercritical CO<sub>2</sub> processes. *Alexandria Engineering Journal*, 61(1), 237–246. <https://doi.org/10.1016/j.aej.2021.04.088>
- Damodaran, S., & Parkin, K. L. (2018). *Química de Alimentos de Fennema* (Artmed (ed.)).
- Díaz Fernández, M. (2021). *INGENIERÍA DE BIOPROCESOS 3a EDICIÓN* (S. A. Ediciones Paraninfo (ed.)).
- Duarte Castillo, A., Díaz Arango, F. O., & Mejía Gutiérrez, L. F. (2023). *Práctica de operaciones unitarias en ingeniería de alimentos*. 276.
- Dutt Tripathi, A., Khosravi-Darani, K., & Kumar Srivastava, S. (Eds.). (2022). *Novel Food Grade Enzymes: Applications in Food Processing and Preservation Industries* (Springer). <https://doi.org/10.1007/978-981-19-1288-7>
- Eixenberger, D., Carballo-Arce, Ana-Francis Vega-Baudrit, José-Roberto Trimino-Vazquez, H., Villegas-Peñaranda, R., Stöbene, A., Aguilar, F., Mora-Villalobos, J.-A., Sandoval-Barrantes, M., Bubenheim, P., & Liese, A. (2022). Tropical agroindustrial biowaste revalorization through integrative biorefineries—review part II: pineapple, sugarcane and banana by-products in Costa Rica. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02721-9>
- FAO, & FAOLEX. (2020). *Ley N° 9825 - Modifica la Ley N° 8839 , Ley para la gestión integral de residuos , y la Ley N° 7554 , Ley Orgánica del Ambiente*. <http://faolex.fao.org/docs/pdf/cos201729.pdf>
- Fernández, E., & Galván, A. (n.d.). 27. *Métodos para la cuantificación de proteínas* (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular (Ed.)). <https://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs/27>  
METODOS PARA LA CUANTIFICACION DE PROTEINAS.pdf
- Franco-Maya, E., Rayas-Amor, Salgado-Cruz, M. de la P., Cruz-Monterrosa, R. ., Jiménez-Guzmán, Miranda de la Lama, G. ., GARCÍA-Garibay, M., & Díaz-

- Ramírez, M. (2018). *Películas comestibles elaboradas con pectina de cáscara de piña (Ananas comosus)*. <https://doi.org/https://doi.org/10.32854/agrop.v11i11.1280>
- Gallardo, L., Sánchez, A., Montalvo, C., & Alonso, A. (2008). Extraction of bromelain from pineapple waste. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 18, 1–4. <http://hdl.handle.net/1834/5225>
- Ganellin, R., Roberts, S., & Roy, J. (2018). *Enzyme Activity*. <https://www.sciencedirect.com/topics/materials-science/enzyme-activity>
- González Salcedo, L. O. (2021). *Alternativas de aprovechamiento de los residuos en la agroindustria*. (Universidad Nacional de Colombia (Ed.)).
- Gorog, S. (2018). Ultraviolet-visible spectrophotometry in pharmaceutical analysis. In C. Press (Ed.), *Ultraviolet-Visible Spectrophotometry in Pharmaceutical Analysis*.
- Gul, A., Siddiqui, M., Arain, H., Khan, S., Khan, H., & Ishrat, U. (2021). Extraction, Partial Purification and Characterization of Bromelain from Pineapple (Ananas Comosus) Crown, Core and Peel Waste. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 64(pH 7), 1–10. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2021200639>
- Hernández Ramírez, G., Ortega Ibarra, E., & Ortega Ibarra, I. H. (2021). 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*, 7(14), 24–28. <https://doi.org/10.29057/icap.v7i14.7232>
- Hielscher. (2023). *Disolución mediante ultrasonidos de sólidos en líquidos*. <https://www.hielscher.com/es/ultrasonic-dissolving-of-solids-in-liquids.htm>
- Hikisz, P., & Bernasinska-Slomczewska, J. (2021). Beneficial properties of bromelain. *Nutrients*, 13(12), 4313. <https://doi.org/10.3390/nu13124313>
- Idayanti, R. W., Arifin, M., Purbowati, E., & Purnomoadi, A. (2022). Utilization of Pineapple Waste as a Roughage Source Diets for Ruminant: A Review. *Advances in Biological Sciences Research*, 20(Itaps 2021), 123–130. <https://doi.org/10.2991/absr.k.220309.026>
- INEC. (2021). *Boletín Técnico No. 44-2020-GAD Municipales: Gestión de Residuos Sólidos*. <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web->

inec/Encuestas\_Ambientales/Municipios\_2020/Residuos\_solidos\_2020/Boletin\_Tecnico\_Residuos\_2020.pdf

INEN. (2016). *Frutas Frescas. Piña. Requisitos. NTE INEN 1836*.  
[https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte\\_inen\\_1836-2.pdf](https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_1836-2.pdf)

Khadhraoui, B., Ummat, V., Tiwari, B. K., Fabiano-Tixier, A. S., & Chemat, F. (2021). Review of ultrasound combinations with hybrid and innovative techniques for extraction and processing of food and natural products. *Ultrasonics Sonochemistry*, 76. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105625>

Kumar, V., Sharmab, N., Umesh, M., Selvaraj, M., Al-shehri, B. M., Chakraborty, P., Duhan, L., Sharma, S., Pasrijah, R., Awasthi, M. K., Lakkaboyana, S. R., Andlerl, R., Bhatnagar, A., & Maitrab, S. (2022). Emerging challenges for the agro-industrial food waste utilization: A review on food waste biorefinery. *Bioresource Technology*, 362. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127790>

LABSTER. (2021). *Cofactor*. [https://theory.labster.com/co-factor-es/\\_info/](https://theory.labster.com/co-factor-es/_info/)

Las Provincias. (2021, February 17). *Un aerogel desarrollado en Valencia permitirá mantener alimentos frescos más tiempo*.  
<https://www.lasprovincias.es/comunitat/investigadores-valencianos-desarrollan-20210217124919-nt.html>

Lim, P. Y. (2018). *Protein determination by Kjeldahl Method* (pp. 1–12). Marine Fisheries Research Department, Southeast Asian Fisheries Development Center.

Mohammad, J., Mohammed, N., & Paridah Md, T. (Eds.). (2020). *Pineapple Leaf Fibers; Processing, Properties and Applications* (Springer). [https://doi.org/10.1007/978-981-15-1416-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-15-1416-6_1)

Mohd Ali, M., Hashim, N., Abd Aziz, S., & Lasekan, O. (2020). Pineapple (Ananas comosus): A comprehensive review of nutritional values, volatile compounds, health benefits, and potential food products. *Food Research International*, 137(September). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109675>

Mohd, N., Abdullah, N., & Muhammad, N. (2018). Effect of Microwave-Assisted Processing on Quality Characteristics of Pineapple Jam. *Journal of Advanced Research in FLuid Mechanics and Thermal Sciences*, 42(1), 20–30.

[www.akademiabaru.com/arfmts.html](http://www.akademiabaru.com/arfmts.html)

- NIH. (2023a). *Bromelain*. National Center for Biotechnology Information. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bromelain>
- NIH. (2023b). *Bromelain*. Department of Health and Human Services National Institutes of Health. <https://www.nccih.nih.gov/health/bromelain>
- NIH. (2023c). *Enzyme*. National Human Genome Research Institute. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Enzyme>
- Nowak, D., & Jakubczyk, E. (2020). The freeze-drying of foods ⇔ the characteristic of the process course and the effect of its parameters on the physical properties of food materials. *Foods*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/foods9101488>
- ONU. (2018). *El desperdicio de comida, una oportunidad para acabar con el hambre*. <https://news.un.org/es/news/topic/sdgs>
- ONU, & FAOLEX. (2020). *Decreto N° 527.- Ley de gestión integral de residuos y fomento al reciclaje*. <http://www.fao.org/faolex/country-profiles/es/>
- Ortigoza-Rodríguez, O., Hernández-Tapia, G., Pérez-Angulo, D., Franco-Jiménez, N., Cantú-Gamboa, B., & Dra María José Rivas Arreola mjriv, G. (2020). Extracción, purificación y cuantificación de bromelina a partir de cáscara de piña, Ananas comosus, para la formulación de un producto dermatológico contra la dermoabrasión. *Investigación y Desarrollo En Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 5, 468–473. <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume5/5/8/92.pdf>
- Oyinloye, T. M., & Yoon, W. B. (2020). Effect of freeze-drying on quality and grinding process of food produce: A review. *Processes*, 8(3), 1–23. <https://doi.org/10.3390/PR8030354>
- Parzanese, M. (n.d.). *Tecnologías para la industria alimentaria - Ultrasonidos*. Subsecretaría de Alimentos y Bebidas. <https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar/HomeAlimentos/Publicaciones/revistas/nota.php?id=223#:~:text=El análisis de alimentos por,distintos productos sometidos a análisis.>
- Ponce, S. M., & Barba, D. (2018). Enzymatic concentration in leaves, bark and latex of papaya and its softening effect in bovine meat. *Novasinerгия Revista Digital De*

*Ciencia, Ingeniería Y Tecnología*, 1(1), 72–79.  
<https://doi.org/10.37135/unach.ns.001.01.09>

- Priyadarshani, S. V. G. N., Cai, H., Zhou, Q., Liu, Y., Cheng, Y., Xiong, J., Patson, D. L., Cao, S., Zhao, H., & Qin, Y. (2019). Green isolation and physical modification of pineapple stem waste starch as pharmaceutical excipient. *Biomolecules*, 9(10), 1–12. <https://doi.org/10.3390/biom9100617>
- Rahma, A., Adriani, M., Rahayu, P., Tjandrawinata, R. R., & Rachmawati, H. (2019). Green isolation and physical modification of pineapple stem waste starch as pharmaceutical excipient. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 45(6), 1029–1037. <https://doi.org/10.1080/03639045.2019.1593438>
- Ramírez-Navas, J. S. (n.d.). *Liofilización de Alimentos* (R. ReCiTeIA (Ed.)).
- Ramírez-Ramírez, J., Loya, J., Ulloa, J., Rosas, P., Gutierrez, R., & Silva, Y. (2021). *Abanico veterinario cáscara de piña para producir ensilado biológico*. <https://doi.org/https://doi.org/10.21929/abavet2020.29>
- Rico, X., Gullón, B., Alonso, J. L., & Yáñez, R. (2020). Recovery of high value-added compounds from pineapple, melon, watermelon and pumpkin processing by-products: An overview. *Food Research International*, 132(December 2019), 109086. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109086>
- Riera, M., Maldonado, S., & Palma, R. (2018). Agro-Industrial Residues Generated in Ecuador for the. *Ingeniería Industrial*, 17(3), 227–246.
- Rivera, A. M. P., Toro, C. R., Londoño, L., Bolivar, G., Ascacio, J. A., & Aguilar, C. N. (2022). Bioprocessing of pineapple waste biomass for sustainable production of bioactive compounds with high antioxidant activity. *Journal of Food Measurement and Characterization*, October. <https://doi.org/10.1007/s11694-022-01627-4>
- Rocha, D. A., Queiroz, E. de R., Botelho, L. N. S., Fráguas, R. M., Santos, C. M. dos, Abreu, C. M. P., & Sousa, R. V. de. (2019). In vitro enzyme activity and in vivo healing activity of the protein extract from pineapple peel. *Acta Scientiarum - Biological Sciences*, 41(1), 10. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v41i1.41466>
- Roda, A., & Lambri, M. (2019). Food uses of pineapple waste and by-products: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 54(4), 1009–1017.

<https://doi.org/10.1111/ijfs.14128>

- Rojas, A., Florez, C., & Lopez, D. (2019). Use Prospects of some agroindustrial waste. *Revista Cubana de Química*, 31, 31–51.
- Romero-Sáez, M. (2022). *Los residuos agroindustriales, una oportunidad para la economía circular*. 25, 71–73.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.22430/22565337.2505>
- Rosero-Delgado, E. A., Zambrano-Arcentales, M. A., Gómez-Salcedo, Y., Baquerizo-Crespo, R. J., & Dustet-Mendoza, J. C. (2021). Biotechnology Applied to Treatments of Agro-industrial Wastes. In *Maddela, N.R., García Cruzatty, L.C., Chakraborty, S. (eds) Advances in the Domain of Environmental Biotechnology. Environmental and Microbial Biotechnology. Springer, Singapore.*  
[https://doi.org/10.1007/978-981-15-8999-7\\_11](https://doi.org/10.1007/978-981-15-8999-7_11)
- Sagar, B., Janezic Stevanovic, T., & Ratti, C. (2020). Freeze-Drying of Plant-Based Foods. *Foods*, 9(87), 22. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/foods9010087>
- Sanewski, G. M., Bartholomew, D. P., & Paull, R. E. (Eds.). (2018). *The Pineapple: Botany, Production and Uses* (Second Edi).
- Santos, D. I., Martins, C. F., Amaral, R. A., Brito, L., Saraiva, J. A., Vicente, A. A., & Moldão-Martins, M. (2021). Pineapple (*Ananas comosus* L.) By-products valorization: Novel Bio Ingredients for Functional Foods. *Molecules*, 26(11), 23.  
<https://doi.org/10.3390/molecules26113216>
- Santos, D. I., Pinto, C. A., Corrêa-Filho, L. C., Saraiva, J. A., Vicente, A. A., & Moldão-Martins, M. (2022). Effect of moderate hydrostatic pressures on the enzymatic activity and bioactive composition of pineapple by-products. *Journal of Food Process Engineering*, 45(7). <https://doi.org/10.1111/jfpe.13537>
- Saptarini, N. M., Rahayu, D., & Kusuma, S. A. F. (2019). Protease activity and characterization of bromelain extract of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr) crown from Subang, Indonesia. *Rasayan Journal of Chemistry*, 12(4), 2074–2081.  
<https://doi.org/10.31788/RJC.2019.1245319>
- Saptarini, Nyi M, Rahayu, D., & Herawati, I. E. (2019). Antioxidant Activity of Crude Bromelain of Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr) Crown from Subang District,

- Indonesia. *Journal of Pharmaceutical & BioAllied Sciences*, 7(10), 1–5.  
[https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS\\_200\\_19](https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_200_19)
- Steingass, C. B., Vollmer, K., Lux, P. E., Dell, C., Carle, R., & Schweiggert, R. M. (2020). HPLC-DAD-APCI-MSn analysis of the genuine carotenoid pattern of pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.) infructescence. *Food Research International*, 127, 108709. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108709>
- Surco Laos, F., Torres, Y., Valle, M., & Panay, J. (2017). Efectos de liofilización sobre composición química y capacidad antioxidante en pulpa de ceatro variedades de *Mangifera indica*. *Soc Quím Perú.*, 83(4), 412–419.  
<http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v83n4/a06v83n4.pdf>
- UNCTAD. (2016). Pineapple. *United Nations Conference on Trade and Development*, 5, 16–17.
- USDA. (2022). *National Nutrient: Piña, Cruda*. United States Department of Agriculture.  
<https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/2346398/nutrients>
- Varelis, P. (2016). Food Chemistry and Analysis. *Reference Module in Food Science*, 0, 2023. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.03341-2>
- Vargas Corredor, Y. A., & Pérez Pérez, L. I. (2018). Use of agro-industrial waste in improving the quality of the environment. *Revista de La Facultad de Ciencias Básicas*, 14(1), 59–72. <http://dx.doi.org/10.18359/rfcb.xxxx>
- Varilla, C., Marcone, M., Paiva, L., & Baptista, J. (2021). Bromelain, a group of pineapple proteolytic complex enzymes (*Ananas comosus*) and their possible therapeutic and clinical effects. a summary. *Foods*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/foods10102249>
- Ventura, R. B., Huamán, L. A., Cepero, V. C., Ames, S. B., & Otiniano, A. J. (2018). *Origen de la piña: Una muy breve Historia*. 1–2.  
[https://www.researchgate.net/publication/344368166\\_Origen\\_de\\_la\\_pina\\_Una\\_muy\\_breve\\_Historia](https://www.researchgate.net/publication/344368166_Origen_de_la_pina_Una_muy_breve_Historia)
- Vollmer, K., Chakraborty, S., Bhalerao, P. P., Carle, R., Frank, J., & Steingass, C. B. (2020). Effect of Pulsed Light Treatment on Natural Microbiota, Enzyme Activity, and Phytochemical Composition of Pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.) juice. *Food and Bioprocess Technology*, 13(7), 1095–1109.

<https://doi.org/10.1007/s11947-020-02460-7>

Wali, N. (2019). Capítulo 3.34 - Piña ( *Ananas comosus* ). In *Suplementos nutricionales no vitamínicos y no minerales* (p. 7). [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812491-8.00050-3](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812491-8.00050-3)

Zhou, W., Ye, C., Geng, L., Chen, G., Wang, X., Chen, W., Sa, R., Zhang, J., & Zhang, X. (2021). Purification and characterization of bromelain from pineapple (*Ananas comosus* L.) peel waste. *Journal of Food Science*, 86(2), 385–393. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15563>

## Anexos

### Anexo 1. Extracción de la bromelina de los residuos de piña



**Figura 8.** Residuos de Piña (corazón y cáscara)





**Figura 9.** Troceado de muestras (corazón y cáscara)



**Figura 10.** Muestras homogenizadas (pulpa, corazón y cáscara)

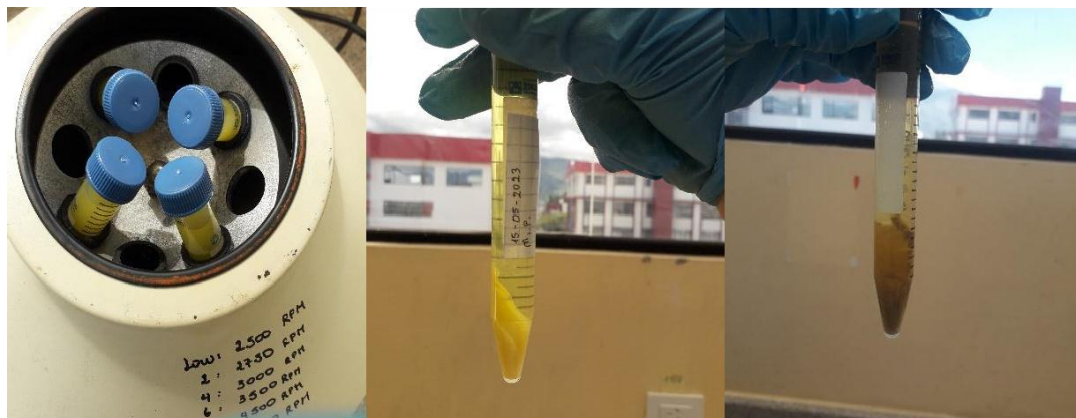


**Figura 11.** Precipitación del extracto de homogeneizado con etanol al 96%



**Figura 12.** Eliminación de bagazo y restos sólidos de mayor tamaño





**Figura 13.** Muestras centrifugadas



**Figura 14.** Filtración del precipitado

## Anexo 2. Liofilización de las muestras



**Figura 15.** Liofilización de los extractos proteicos

## Anexo 3. Cálculo Demostrativo del rendimiento de enzima obtenida

- Rendimiento de la enzima obtenida de la M0 pulpa:

$$RP (\%) = \frac{\text{Muestra seca (g)gramos}}{\text{Muestra inicial (Pulpa homogeneizada) (g)gramos}} \times 100$$

$$RP (\%) = \frac{14,937 \text{ g}}{825,381 \text{ g}} \times 100$$

$$RP (\%) = 1,810$$


## Anexo 4. Resultados del análisis de proteína



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA**  
**LABORATORIO DE CONTROL Y ANÁLISIS DE ALIMENTOS**

### CERTIFICADO DE ANALISIS DE LABORATORIO

01034

<b>Certificado No: 23-119</b>		R01-7.8.03				
Solicitud N°: 23-119		Pag.: 1 de 1				
Fecha recepción: 19 de junio de 2023	Fecha de ejecución de ensayos: 20 de junio de 2023					
<b>Información del cliente:</b>						
Empresa:	C.I./RUC: 1805362041					
Representante: Tatiana Garces	TIF: 0997462936					
Dirección: Ambato	Email: tgarces2041@uta.edu.ec					
Ciudad: Ambato						
<b>Descripción de las muestras:</b>						
Producto: Bromelina	Peso / Volumen:	2 g cada una				
Marca comercial: n/a	Tipo de envase:	envase plástico				
Lote: n/a	No de muestras:	tres				
F. Elb.: n/a	F. Exp.: n/a					
Conservación: Ambiente: X Refrigeración: Congelación:	Almac. en Lab:	30 días				
Cierres seguridad: Ninguno: X Intactos: Rotos:	Muestreo por el cliente:	16 de junio de 2023				
<b>RESULTADOS OBTENIDOS</b>						
Muestras	Código del laboratorio	Código cliente	Ensayos solicitados/Técnica	Métodos utilizados	Unidades	Resultados
Bromelina de la pulpa de piña	11923243	Ninguno	Proteína, Kjeldhal	AOAC Ed. 21, 2019 2001.11	%(Nx6,25)	5,19
Bromelina del corazón de piña	11923244	Ninguno	Proteína, Kjeldhal	AOAC Ed. 21, 2019 2001.11	%(Nx6,25)	5,18
Bromelina de la cáscara de piña	11923245	Ninguno	Proteína, Kjeldhal	AOAC Ed. 21, 2019 2001.11	%(Nx6,25)	7,34
Conds. Ambientales: 20,8°C; 50,1%HR						
 Ing. Gabriela Flores Directora						
Autorización para transferencia electrónica de resultados: Si						
Fecha de emisión del certificado: 21 de Junio de 2023						

Nota: La muestra fue suministrada por el cliente y los resultados se aplican a la muestra en las condiciones recibidas. El Laboratorio se responsabiliza exclusivamente de los resultados emitidos en base a la muestra entregada por el cliente.  
 El Laboratorio no es responsable por el uso incorrecto de este certificado. No es un documento negociable. Solo se permite su reproducción sin fines de lucro y haciendo referencia a la fuente.

"La información que se está enviando es confidencial, exclusivamente para su destinatario, y no puede ser vinculante. Si usted no es el destinatario de esta información recomendamos eliminarla inmediatamente. La distribución o copia del mismo está prohibida y será sancionada según el proceso legal pertinente".





## Anexo 5. Ensayo espectrofotométrico

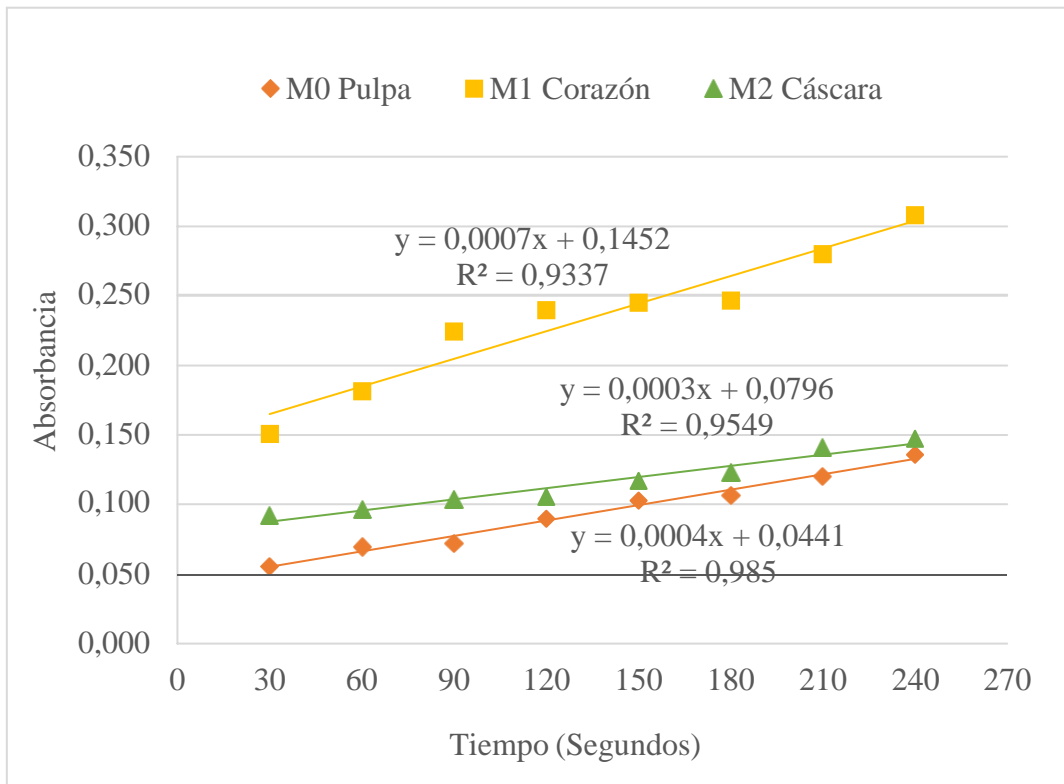


**Figura 16.** Preparación de soluciones, diluciones y medida de absorbancia en el espectrofotómetro

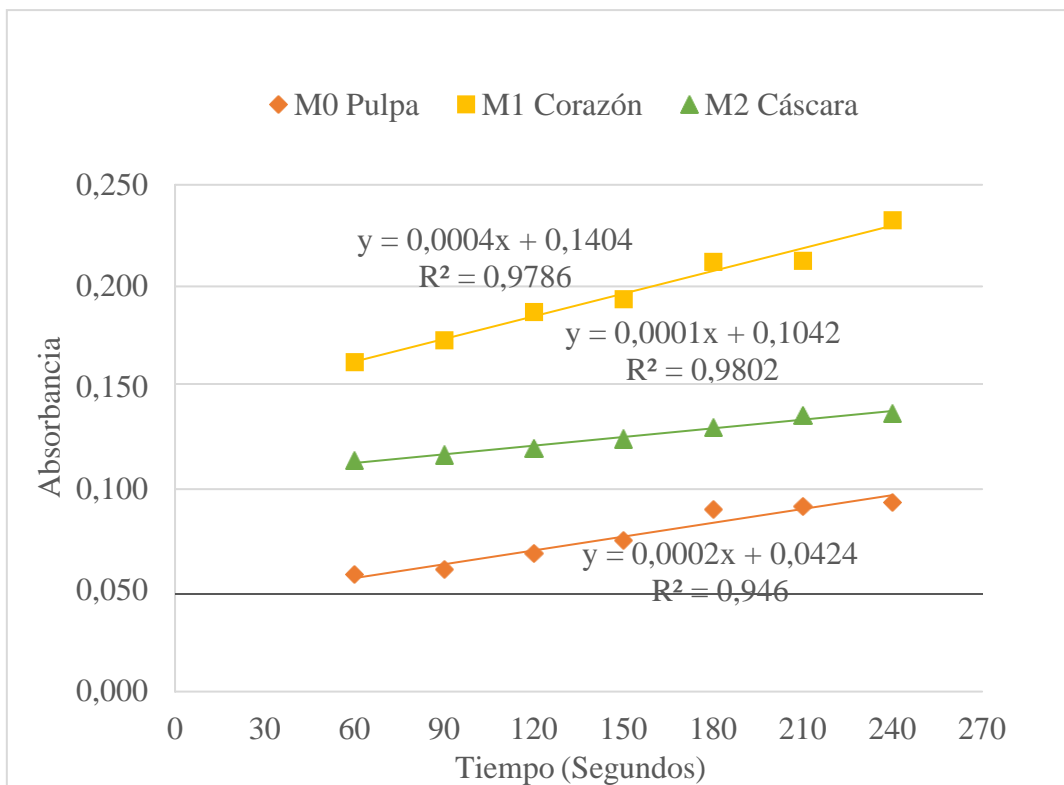
## Anexo 6. Variación de absorbancia y cálculo de la actividad enzimática

**Tabla 9.** Variación de absorbancia calculada a partir de la pendiente de la recta

Muestras	Con Baño Ultrasónico	Con agitación Magnética
	$\Delta A$ (Variación de absorbancia)	
M0 Pulpa (Control)	$4 \times 10^{-4}$	$2 \times 10^{-4}$
M1 (Corazón)	$7 \times 10^{-4}$	$4 \times 10^{-4}$
M2 (Cáscara)	$3 \times 10^{-4}$	$1 \times 10^{-4}$



**Figura 17.** Regresión lineal de las muestras con Baño Ultrasónico



**Figura 18.** Regresión lineal de las muestras con Agitación Magnética

- Cálculo demostrativo de la actividad enzimática total y específica

Actividad enzimática total de la M0 Pulpa:

$$AE = \frac{\frac{4 \times 10^{-4}}{15} \times 60 \text{ min} \times 10}{0,01 \text{ (cm)}^{-1} \times 0,5 \text{ cm} \times 2061,98 \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)} \times 10^6 \quad (\mu\text{mol/ min. ml})$$

$$AE = 96,994 \text{ (}\mu\text{mol/ min. ml)}$$

Actividad enzimática específica de la M0 Pulpa:

$$AEe = \left( \frac{96,994 \text{ }\mu\text{mol/ min. ml}}{0.519 \text{ mg/ml}} \times 10^{-6} \right) \text{ (mol/ min .mg)}$$

$$AEe = 1.87 \times 10^{-4} \text{ (mol/ min .mg)}$$

Concentración de proteína de la M0 Pulpa:

$$[\text{Prot}] = \left( \frac{5,19 \% \times 1 \text{ gramo}}{100 \text{ ml}} \times 10^3 \right)$$

$$[\text{Prot}] = 0,519 \text{ mg/ml}$$



**Tabla 10.** Resultados de Absorbancia de las muestras analizadas

<b>ABSORBANCIA - BAÑO ULTRASÓNICO</b>													
Reacción	Tiempo (Segundos)	<b>M0 Pulpa</b>				<b>M1 Corazón</b>				<b>M2 Cáscara</b>			
		R1	R2	R3	Promedio	R1	R2	R3	Promedio	R1	R2	R3	Promedio
Blanco	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1	30	0,052	0,056	0,059	0,056	0,151	0,145	0,156	0,151	0,090	0,089	0,098	0,092
2	60	0,065	0,076	0,067	0,069	0,185	0,170	0,189	0,181	0,097	0,098	0,095	0,097
3	90	0,065	0,075	0,076	0,072	0,232	0,228	0,213	0,224	0,101	0,106	0,104	0,104
4	120	0,096	0,084	0,089	0,090	0,232	0,242	0,245	0,240	0,107	0,106	0,104	0,106
5	150	0,101	0,105	0,103	0,103	0,239	0,251	0,245	0,245	0,116	0,117	0,118	0,117
6	180	0,105	0,106	0,109	0,107	0,239	0,234	0,267	0,247	0,111	0,123	0,135	0,123
7	210	0,112	0,123	0,125	0,120	0,276	0,287	0,277	0,280	0,131	0,145	0,146	0,141
8	240	0,134	0,135	0,138	0,136	0,299	0,306	0,319	0,308	0,148	0,146	0,148	0,147
<b>ABSORBANCIA - AGITACIÓN MAGNÉTICA</b>													
Reacción	Tiempo (Segundos)	<b>M0 Pulpa</b>				<b>M1 Corazón</b>				<b>M2 Cáscara</b>			
		R1	R2	R3	Promedio	R1	R2	R3	Promedio	R1	R2	R3	Promedio
Blanco	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1	30	0,058	0,056	0,059	0,058	0,116	0,112	0,124	0,117	0,121	0,115	0,104	0,113
2	60	0,059	0,054	0,068	0,060	0,165	0,162	0,161	0,163	0,117	0,112	0,113	0,114
3	90	0,074	0,061	0,069	0,068	0,169	0,187	0,164	0,173	0,121	0,115	0,114	0,117
4	120	0,079	0,078	0,067	0,075	0,179	0,187	0,196	0,187	0,122	0,120	0,118	0,120
5	150	0,085	0,094	0,091	0,090	0,183	0,197	0,201	0,194	0,123	0,124	0,127	0,125
6	180	0,089	0,087	0,098	0,091	0,188	0,223	0,225	0,212	0,131	0,128	0,132	0,130
7	210	0,091	0,094	0,095	0,093	0,188	0,224	0,226	0,213	0,138	0,137	0,134	0,136
8	240	0,093	0,098	0,098	0,096	0,227	0,228	0,243	0,233	0,138	0,134	0,140	0,137