



**UNIVERSIDAD NACIONAL
“PEDRO RUIZ GALLO”
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA E
INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**



ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

TESIS

Efecto de la concentración del etanol en el rendimiento de extracción de
papaína a partir de gualacongo (*Vasconcellea pubescens*)

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
INGENIERA DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

AUTORAS:

Bach.: Cuchupoma Vásquez Lizbet

Bach.: Orozco Fernández Adsumi Esther

ASESOR:

Ing. MSc. JUAN FRANCISCO ROBLES RUIZ

LAMBAYEQUE – PERÚ

2020



UNIVERSIDAD NACIONAL “PEDRO RUIZ GALLO”

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA E INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS



TESIS

Efecto de la concentración del etanol en el rendimiento de extracción de
papaína a partir de gualacongo (*Vasconcellea pubescens*)

AUTORAS:

Bach.: Cuchupoma Vásquez Lizbet

Bach.: Orozco Fernández Adsumi Esther

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERA DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

APROBADO POR:

PRESIDENTE

Dr. ABRAHAM G. YGNACIO SANTA CRUZ

SECRETARIO

M.Sc. RUBÉN DARÍO SACHÚN GARCÍA

VOCAL

Dr. SEBASTIÁN HUANGAL SCHEINER

ASESOR

Ing. M.Sc. JUAN F. ROBLES RUIZ

2020

DEDICATORIAS

A mis hijos: Ariana Lizbet, Andhy Jhordan y Alexander Kyle seres maravillosos que a su corta edad me han enseñado a encontrar el lado dulce y no amargo de la vida, son y siempre serán mi motivación más grande.

A mis padres: Leopoldo Cuchupoma Altamirano y Genoveva Vásquez Ramírez quienes con su amor, esfuerzo y paciencia me han fortalecido para llegar a cumplir cada una de mis metas trazadas; gracias por inculcar siempre en mí, el ejemplo de esfuerzo y valentía para no temer a enfrentar las adversidades que se me presenten a lo largo de mi vida.

A mis hermanos: Roxana y Paul por su amor y apoyo incondicional durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento, por sus oraciones, consejos y palabras de aliento que hicieron posible hoy la culminación de esta etapa de mi vida.

A mi compañero de vida: Alexander, por siempre ayudarme y motivarme a pesar de las situaciones difíciles que me ha tocado pasar en el desarrollo de este proyecto.

Cuchupoma Vásquez, Lizbet

A la memoria de mi hermana Angélica de la Cruz, que en todo momento desde su partida ha estado en mi pensamiento.

A mis padres: ANGEL OROZCO BERRU y ESTHER FERNANDEZ RAMOS, quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo y valentía, de no temer las adversidades que da la vida porque Dios está conmigo siempre.

A mis hermanos Julio, Heiner y Ángel por su cariño y apoyo incondicional, durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento gracias.

A mi tía Norma Orozco, porque durante varios años facilitó mi investigación para mi preparación profesional compartiendo su hogar conmigo.

A todos ellos gracias porque con su recuerdo, con sus oraciones, consejos y palabras de aliento que hacen de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas.

Orozco Fernández, Adsumi Esther

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por bendecirme con la vida, por guiarme a lo largo de mi existencia, ser el apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad y de debilidad.

Gracias papá, mamá, hermanos, por ser los principales artífices para cumplir este sueño, por confiar y creer en mí y ser siempre mi apoyo.

Agradezco también a los docentes de la Escuela Profesional de Ingeniería de Industrias Alimentarias, por haber compartido sus conocimientos a lo largo de mi preparación universitaria.

Cuchupoma Vásquez, Lizbet

Me van a faltar páginas para agradecer a las personas que se han involucrado en la realización de este trabajo, sin embargo merecen reconocimiento especial mi Madre y mi Padre que con su esfuerzo y dedicación me ayudaron a culminar mi carrera universitaria y me dieron el apoyo suficiente para no decaer cuando todo parecía complicado e imposible.

Así mismo, agradezco infinitamente a mis hermanos y tía que con sus palabras me hacían sentir orgulloso de lo que soy y de lo que les puedo enseñar.

De igual forma, agradezco a mi asesor de Tesis, que gracias a sus consejos y correcciones hoy puedo culminar este trabajo. A los Profesores que me han visto crecer como persona, y gracias a sus conocimientos hoy puedo sentirme dichosa y contenta.

Orozco Fernández, Adsumi Esther

ÍNDICE

	Pág.
DEDICATORIAS.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iv
INTRODUCCIÓN.....	13
I. MARCO TEÓRICO.....	15
1.1. El gualaongo (<i>Vasconcellea pubescens</i>).....	15
1.1.1 Generalidades.....	15
1.1.2 Clasificación taxonómica del gualaongo.....	17
1.1.3 Distribución.....	18
1.1.4 Descripción.....	18
1.1.5 Componentes no enzimáticos del gualaongo.....	20
1.1.6 Capacidad antioxidante de extractos de <i>Vasconcellea pubescens</i>	21
1.1.7 Usos.....	25
1.2. Extractos vegetales.....	25
1.2.1 Proceso de extracción.....	26
1.2.2 Características de los extractos.....	26
1.2.3 Métodos de extracción.....	27
1.3. Enzimas proteolíticas.....	29
1.3.1 Clasificación de las enzimas proteolíticas.....	30
1.3.2 Usos medicinales de las enzimas proteolíticas.....	31
1.3.3 Papaína.....	33
1.3.3.1 Características fisicoquímicas de la papaína.....	34

1.3.3.2 Biodisponibilidad de la papaína.....	36
1.3.3.3 Panorama de la producción de papaína en el mundo	38
II. MARCO METODOLÓGICO.....	40
2.1. Área de ejecución.....	40
2.2. Tipo de investigación.....	40
2.3. Población y muestra	40
2.3.1. Población	40
2.3.2. Muestra.....	40
2.4. Variables.....	40
2.4.1 Variables independientes.....	40
2.4.2 Variables dependientes	41
2.5. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	41
2.5.1. Equipos e instrumentos de laboratorio.....	41
2.5.2. Materiales.....	42
2.5.3. Materiales de escritorio.....	43
2.5.4. Reactivos y soluciones.....	43
2.5.5. Instrumentos para la recolección de datos.....	43
2.5.6. Método de análisis.....	44
2.5.6.1. Análisis físico químico.....	44
2.6. Metodología Experimental.....	45
2.6.1 Caracterización de la Materia Prima.....	45
2.6.1.1. Características biométricas.....	45
2.6.1.2. Análisis físico químico.....	45
2.6.2. Acondicionamiento del gualaongo para evaluación de los tratamientos.....	45

2.6.3. Evaluación del rendimiento y caracterización del producto obtenido.....	49
2.6.3.1. Evaluación del rendimiento.....	49
2.6.3.2. Caracterización del producto obtenido.....	49
2.6.4. Análisis estadístico.....	49
III. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	51
3.1. Caracterización de la materia prima.....	51
3.1.1. Características biométricas.....	51
3.1.2. Análisis fisicoquímico.....	51
3.2. Evaluación de los tratamientos.....	53
3.2.1. Obtención del extracto enzimática.....	53
3.3. Caracterización del extracto seleccionado.....	59
IV. CONCLUSIONES.....	61
V. RECOMENDACIONES.....	62
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	63
VII. ANEXOS.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Clasificación taxonómica de las especies de Vasconcelleas estudiadas en el presente trabajo.....	16
Figura 2 Papayita de monte, recuperado de la Tesis: Obtención de un filtrante de papayita de monte (<i>Carica pubescens</i>) utilizando dos técnicas de secado y diferentes partes del fruto.....	19
Figura 3 Clasificación de métodos de extracción.....	28
Figura 4 Estructura tridimensional de la papaína.....	34
Figura 5 Flujo de operaciones para la obtención de extracción de papaína a partir de gualaongo (<i>Vasconcellea pubescens</i>).....	48
Figura 6 Comparación de medias para el rendimiento de papaína.....	59
Figura 7 Recepción de la materia prima.....	85
Figura 8 Acondicionamiento de la materia prima.....	85
Figura 9 Fraccionamiento de la materia prima.....	86
Figura 10 Trituración de la materia prima.....	86
Figura 11 Adición del solvente.....	87
Figura 12 Centrifugación.....	87
Figura 13 Secado en la estufa.....	87

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 <i>Componentes físico-químicos de la pulpa del fruto de V. pubescens</i>	20
Tabla 2 Capacidad antioxidante y contenido de compuestos bioactivos.....	24
Tabla 3 Operacionalización de Variables independientes y dependientes para el estudio del efecto de la concentración del etanol en el rendimiento de extracción de papaína a partir de gualaongo (<i>Vasconcellea pubescens</i>).....	41
Tabla 4 Métodos de análisis físico químicos.....	44
Tabla 5 Análisis de varianza para los tratamientos.....	50
Tabla 6 Características biométricas del fruto de gualaongo (<i>Vasconcellea pubescens</i>).....	51
Tabla 7 Resultado del análisis fisicoquímico del gualaongo.....	52
Tabla 8 Estadísticos descriptivos para los análisis fisicoquímicos del gualaongo.....	53
Tabla 9 Rendimientos de la extracción de papaína a diferentes niveles de etanol.....	54
Tabla 10 Homogeneidad de varianza para rendimiento de papaína.....	55
Tabla 11 Pruebas de efectos inter-sujetos para variable rendimiento de papaína.....	56
Tabla 12 Prueba de comparaciones múltiples para variable rendimiento de papaína.....	57
Tabla 13 Prueba de comparación de medias de tukey para subconjuntos homogéneos.....	58
Tabla 14 Caracterización del extracto de papaína a partir de gualaongo utilizando como solvente etanol 96°.....	60

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1 Métodos de análisis fisicoquímico.....	73
ANEXO 2 Tomas fotográficas del proceso de extracción de papaína a partir de gualacongo.....	85
ANEXO 3 Análisis estadístico.....	88

RESUMEN

La presente investigación fue realizada en la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo y tuvo como objetivo principal evaluar el efecto de la concentración del etanol en el rendimiento de extracción de papaína a partir de gualacongo (*Vasconcellea pubescens*). Con el propósito de tener una alternativa a la demanda de papaína para el ablandamiento de carnes entre otros usos.

Los frutos de gualacongo se obtuvieron del caserío Raime perteneciente a la provincia de Cutervo - Cajamarca. Los frutos fueron caracterizados biométrica y fisicoquímicamente, posteriormente se hizo el proceso de extracción de papaína con el empleo del solvente etanol a diferentes concentraciones (76°GL, 86°GL y 96°GL), posteriormente se deshidrató y trituró el extracto y se evaluaron estadísticamente los resultados (rendimiento), obteniéndose como respuesta que la concentración de etanol con 96°GL presentó el mayor rendimiento 6,29%. Así mismo se caracterizó el concentrado enzimático, presentando 6,82% de humedad y 93,18% de materia seca. Finalmente se concluye que es posible emplear al etanol como solvente para la extracción de papaína del gualacongo.

Palabras clave: gualacongo, extracción, papaína, enzima.

ABSTRACT

The present research was carried out at the National University of Pedro Ruiz Gallo and its main objective was to evaluate the effect of ethanol concentration on the extraction yield of papain from gualacongo (*Vasconcellea pubescens*). With the purpose of having an alternative to the demand of papain for the softening of meat among other uses.

Gualacongo fruits were obtained from the Raime farmhouse belonging to the province of Cutervo - Cajamarca. The fruits were characterized biometrically and physicochemically, later the process of extraction of papain was done with the use of the ethanol solvent at different concentrations (76 ° GL, 86 ° GL and 96 ° GL), later the extract was dehydrated and crushed and evaluated statistically the results (yield), obtaining in response that the concentration of ethanol with 96 ° GL presented the highest yield 6.29%. Likewise, the enzyme concentrate was characterized, presenting 6.82% humidity and 93.18% dry matter. Finally, it is concluded that it is possible to use ethanol as a solvent for the extraction of papain from the gualacongo.

Keywords: gualacongo, extraction, papain, enzyme.

INTRODUCCIÓN

El uso mundial de aditivos en la industria alimentaria va en aumento cada vez más, ya que permite prolongar el tiempo de vida útil de los alimentos lo que hace que exista mayor aprovechamiento de los mismos, de igual forma los aditivos permiten realizar determinados tratamientos tecnológicos que sin ellos sería imposible.

Las enzimas son biocatalizadores, agentes de origen biológico que aceleran la velocidad a la cual ocurren las reacciones químicas al disminuir los requerimientos de energía de activación necesaria para dichas reacciones (Cornish, 1995). Las enzimas no se consumen en el proceso, por lo que una molécula de enzima sigue actuando.

La catálisis enzimática, como se denomina a la acción de las enzimas es eficiente, altamente específica, puede llevarse a cabo en condiciones relativamente suaves como temperatura ambiente y pH neutro y permite un control muy preciso de la reacción. Por ello, la aplicación de las enzimas a la industria se constituye en uno de los primeros procesos biotecnológicos de la química moderna (Roberts y Turner, 1995).

Las enzimas han encontrado un gran número de aplicaciones en la industria, una de las clases de enzimas con mayor amplitud de aplicación son las proteasas. Las proteasas son enzimas que provocan la hidrólisis o digestión de otras proteínas en fragmentos más pequeños y en ciertas condiciones pueden ser usadas para la síntesis de nuevos compuestos de interés farmacéutico (Chaiwut y Kanasawud, 2007). Una de las proteasas cuyo uso se encuentra muy difundido es la papaína, en realidad una mezcla de papaína y quimopapaína, que es extraída generalmente del látex de los frutos verdes de la *Carica papaya*.

El Perú es un país que cuenta con una gran biodiversidad en frutos los cuales no han sido estudiados hasta la actualidad, tal es el caso del gualacongo, fruto silvestre que crece en la provincia de Cutervo pero que por desconocimiento de los pobladores no tiene aprovechamiento alguno. Este fruto posee a parte de sus propiedades organolépticas, importantes propiedades químicas, una de ellas, la papaína (que posee un látex que tiene 8 veces más actividad proteolítica que el látex de la papaya), aditivo usado en la industria alimentaria para el ablandamiento en carnes (Quino, Bernal y Yácono, 2008), así también cerca del 80% de la cerveza producida en los Estados Unidos es tratado con papaína, la cual digiere los fragmentos de proteína que pueden precipitar, gracias a esta acción la cerveza se mantiene transparente cuando se enfría (Duke y DuCellier, 1993).

En concordancia con lo expuesto se plantea la presente investigación que busca obtener un mayor rendimiento en la obtención de la papaína mediante el método de extracción con etanol a partir de gualacongo; planteando los siguientes objetivos:

- ❖ Evaluar el efecto de la concentración del etanol en el rendimiento de extracción de papaína a partir de gualacongo (*Vasconcellea pubescens*)
- ❖ Caracterizar biométricamente al gualacongo
- ❖ Determinar las características físico químicas de la pulpa de gualacongo
- ❖ Determinar la concentración adecuada de etanol para obtener un mayor rendimiento en la extracción de papaína a partir de gualacongo.
- ❖ Determinar el porcentaje de humedad y materia seca al extracto de papaína obtenido.

I. MARCO TEÓRICO

1.1. El gualacongo (*Vasconcellea pubescens*)

1.1.1 Generalidades

La familia *Caricaceae* comprende 6 géneros y más de 50 especies (entre 30 y 60 según distintos autores), distribuidas a través del trópico desde el nivel del mar hasta los 3500 m. de altura. En América se encuentran cinco de los seis géneros, con excepción de *Cylicomorpha* (África). La especie económicamente más importante y distintiva de la familia es la papaya común (*Carica papaya* L.) que pertenece al género *Carica* el cual es monotípico. Puede encontrarse con los nombres comunes de papaya, papayo, mamón, lechosa, entre otros. Se la puede hallar en floración y fructificación durante casi todo el año. Se distribuye ampliamente en América tropical, incluyendo México, Sudamérica y las Antillas. Desde hace varias décadas, la papaya ha sido la fuente más importante de papaína natural con fines industriales, sin poder ser reemplazada en la actualidad por ningún otro sustituto sintético.

El presente trabajo tratará sobre el género *Vasconcellea*, menos conocido, pero también perteneciente a la familia de las Caricáceas, el cual contempla especies nativas que pueden ser encontradas desde México hasta el norte de Argentina en alturas comprendidas entre los 1700 a 3500 msnm. Cuenta con 21 especies y un híbrido natural.

El género *Vasconcellea* se consideraba anteriormente una sección del género *Carica*, el cual fue rehabilitado por Badillo (1971) sobre la base de caracteres morfológicos y genéticos. Los estudios de divergencia genética entre ambos géneros fluctúan entre 73% y 77% (Kyndt, Romeijn, Van, Romero, Gheysen y Goetghebeur, 2005). Cuenta con 21 especies de *Caricaceae*, lo que lo convierte en el mayor de los

seis géneros de la familia. Se encuentra con más frecuencia a lo largo de los Andes en América del Sur desde el nivel del mar hasta cerca de los 3500 m, con una concentración de especies en Ecuador, donde se pueden hallar 16 de las 21 especies (Kyndt *et al.*, 2005).

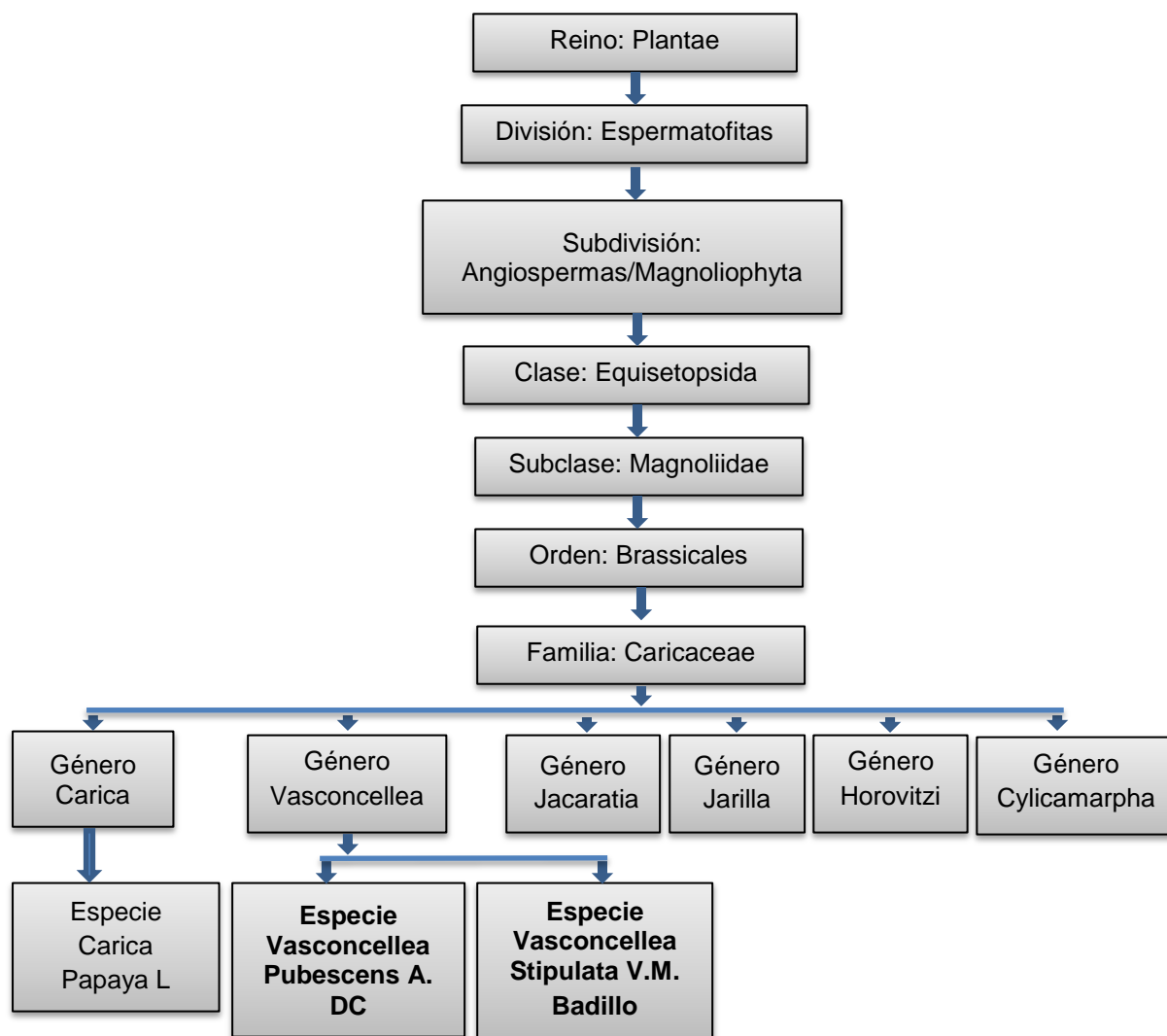


Figura 1 Clasificación taxonómica de las especies de *Vasconcellea* estudiadas en el presente trabajo, Recuperado de Espinosa (2016)

Por otra parte, los demás miembros del género *Vasconcellea* son consumidos tradicionalmente, aunque en mínima escala en el sur de Ecuador como en otras regiones andinas compartiendo los nombres comunes de papayo de altura, papayo de monte, chihualcán, chamburo, siglalón, entre otros (Badillo, 1971).

Probablemente ellas hayan sido obtenidas de los bosques andinos y puestas en cultivo en los huertos familiares, pues presentan un agradable aroma y alto grado de fragancia (mayor a la del babaco) por su alta concentración de terpenos en sus frutos.

V. pubescens y *V. stipulata* tienen frutos que en estado maduro se consumen crudos o cocidos en forma de mermeladas y bebidas; además, como se ha mencionado, sus hojas y látex se usan en medicina tradicional para diversas afecciones (Acosta, 1992).

Como miembros de la familia *Caricaceae*, las especies del género *Vasconcellea* también son una buena fuente de enzimas proteolíticas. La droga vegetal de estas especies es el látex circulante, el cual contiene altas cantidades de papaína y otras enzimas proteolíticas que constituyen principios activos de estas plantas (Walraevens, Jaziri, Van, Schnek, Kleinschmidt y Looze, 1993).

1.1.2 Clasificación taxonómica del gualacongo

Según Castilla (2016), la clasificación taxonómica del gualacongo se expresa a continuación:

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Subclase: *Dilleniidae*

Orden: *Violales*

Familia: *Caricaceae*

Género: *Carica*

Especie *Carica pubescens*

Nombre común: Es conocida como la "Papaya de los Andes", "Papaya de Altura", "Papaya Arequipeña" o "Papaya Andina".

1.1.3 Distribución

Esta planta pertenece al género *Carica*, originario de América tropical y subtropical, compuesto por más de 40 especies nativas, entre las que se destaca la papaya (*Carica papaya*) por ser la más conocida y distribuida en las zonas tropicales. La papayuela (*Carica pubescens* L) es una especie frutal nativa de América tropical que se cultiva en altitudes entre 2400 y 2800 m. (Duque y Morales, 2005).

Es una planta originaria de las alturas de Colombia, Ecuador, Bolivia y Perú (Arequipa, Apurímac, Cusco, Huánuco y Junín) crece entre los 2,000 y 3,000 m.s.n.m. (Chávez, 2013).

Se distribuye desde Panamá hasta Chile y Argentina alrededor de los pueblos montañosos (Duque y Morales, 2005).

La especie andina *Carica pubescens* L se cultiva con éxito en las huertas caseras debido a sus cualidades ornamentales (Duque y Morales, 2005).

1.1.4 Descripción

La papayuela (*Carica pubescens* L Lenne & Koch) tiene una apariencia similar a la de la papaya (*Carica papaya*).

Es una planta arborescente que alcanza hasta 10 m de alto. Tiene hojas grandes que se distinguen de las de la papaya por su forma y por la presencia de una pubescencia que cubre las hojas y las flores. El fruto es muy aromático, de color amarillo claro, oblongo-elíptico, truncado en la base y agudo en el ápice, de 7 a 11 cm de largo y 5 a 6 cm de diámetro, con cinco costillas muy pronunciadas. La pulpa, ligeramente amarilla, constituye cerca del 60 % del peso total de la fruta y contiene numerosas semillas en la cavidad central cubiertas por una membrana dulce, transparente y gelatinosa. (Duque y Morales, 2005).

Antes de alcanzar la madurez, el fruto exuda un látex, al que se le han atribuido propiedades medicinales para el tratamiento de la micosis y otras enfermedades de la piel. Generalmente, no se consume al natural, sino procesada en forma de jugos o conservas (Duque y Morales, 2005).



Figura 2 Papayita de monte, recuperado de la Tesis: Obtención de un filtrante de papayita de monte (*Carica pubescens*) utilizando dos técnicas de secado y diferentes partes del fruto, Atalaya (2017)

1.1.5 Componentes no enzimáticos del gualacongo

Los frutos de *V. pubescens* han sido más estudiados que los de *V. stipulata* en cuanto a sus componentes. Bernal y Correa (1990) analizaron la composición nutricional de la pulpa de, *V. pubescens* la cual corresponde al 45% del peso de la fruta en fresco. Los hallazgos derivados de este análisis se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 1

Componentes físico-químicos de la pulpa del fruto de V. pubescens

Componente	Cantidad
Agua	93,5 g
Proteínas	0,7 g
Grasas	0,1 g
Carbohidratos	3,9 g
Fibra	1,2 g
Ceniza	0,6 g
Calcio	10 mg
Fósforo	11 mg
Hierro	0,3 mg
Vitamina A	100 U.I.
Tiamina	0,03 mg
Riboflavina	0,03 mg
Niacina	0,06 mg
Ácido Ascórbico	70 mg
Energía	16 Kcal.

Nota. Bernal y Correa (1990)

Simirgiotis, Caligari y Schmeda (2009) aislaron glicósidos de rutina y manghaslina de los frutos de *V. pubescens* cultivados en Chile, mediante fraccionamiento selectivo usando el ensayo de radicales libres DPPH. Además, 19 compuestos fenólicos fueron identificados por primera vez en los frutos mediante HPLC, UV y

espectrometría de masas. Diez de estos compuestos se caracterizaron tentativamente como glicósidos del ácido hidroxicinámico y nueve como derivados de glicósidos de quercetina. Varias de estas sustancias de bajo peso molecular se están investigando en la actualidad por sus propiedades antioxidantes y algunas de ellas han demostrado efectos fitomedicinales muy notables en el aparato cardiovascular (Rangel, Pastor, Aguilera y Gil 2015).

En *V. pubescens*, Noriega, Calero, Larenas, Maldonado y Vita (2014) detectaron un total de 38 compuestos volátiles en sus frutos. Se identificaron a 20 de ellos, lo que equivale al 92,65 %. Los compuestos más abundantes identificados fueron: etil-hexanoato con el 44,211 %; etil-butanoato con el 12,352 %; 1-octanol 9,142 % y el linalol con el 6,529 %.

Puede concluirse que los frutos presentan también cantidades interesantes de metabolitos primarios y secundarios de acción medicinal, sin embargo, la principal droga vegetal de la familia *Caricaceae* la constituye el látex, por la gran cantidad que poseen estas especies vegetales.

1.1.6 Capacidad antioxidante de extractos de *Vasconcellea pubescens*

En general, los componentes de las plantas tienen capacidad antioxidante debido a su naturaleza unos en menor o mayor grado que otros debido a las diferentes rutas metabólicas como parte de su defensa, adaptación o algún otro factor importante para su permanencia y perpetuación. El fruto de papaya de monte ha destacado por su aroma fuerte y agradable además de la alta cantidad de papaína que presenta a diferencia de otras Caricáceas. El aroma característico viene determinado por los compuestos volátiles que presenta, los cuales han sido identificados de diversas

maneras. Dietrich, Beuerle, Withopf, Schreier, Brunerie, Bicchi y Schwab (1997), en un estudio realizado para identificar compuestos relacionados con el aroma de diversos frutos identificaron 6'-O-malonilato β -D-glucopiranosidos de alcohol benzil, 2-feniletanol y geraniol en la corteza del fruto. Varios alcoholes, aldehídos, cetonas y glucósidos de etil y butil 3-hidroxibutanoatos han sido identificados en extractos de la pulpa de *Vasconcellea pubescens* de muestras colectadas en Chile (Idstein, Keller, Schreier, 1985) y Colombia (Krajewski, Duque y Schreier, 1997; Morales y Duque, 1987); sin embargo, en las especies en Chile se ha encontrado adicionalmente otros compuestos volátiles como metil cis-hex-3-enoato, isopentil acetato, metil 3-hidroxihexanoato etil nicotinato y otros, lo que significa que las variaciones climatológicas y geográficas puede generar ligeras diferencias en las rutas metabólicas de los compuestos implicados en el aroma de la fruta. Otra variación importante en cuanto a la producción de metabolitos secundarios en *Vasconcellea pubescens* está relacionada al grado de madurez del fruto, pues a medida que madura la piel cambia desde un color verde a amarillo producto de la producción de pigmentos carotenoides y el aroma se intensifica, asumiendo que podría deberse al incremento de producción de etileno como pasa en otros frutos, donde se ha determinado que muchos ésteres derivados de las vías metabólicas de los ácidos grasos y aminoácidos varían en función de la producción de etileno (Balbontín, 2007). Con el desarrollo de nuevas técnicas para la identificación de compuestos orgánicos Simirgiotis *et al.* (2009) han identificado 19 compuestos fenólicos en extracto metanólico de pulpa del fruto de papaya de monte, todos ellos mediante una afinidad al DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhidrazil), lo que quiere decir que tienen capacidad antioxidante destacando la rutina quercetin glucósido y mangaslina. Muchos de los compuestos mencionados anteriormente tienen

capacidad antioxidante, sin embargo, no hay una concentración definitiva de cada uno de ellos que garantice una capacidad antioxidante determinada sólo una referencial.

Diferentes metodologías han sido empleadas para evaluar la capacidad antioxidante de frutas in vitro, tales como FRAP (Poder antioxidante de reducir el ion férrico), ABTS (Neutralización del catión radical 2,2' Azinobis-3-etil- benzotiazolina-6-acido sulfónico), DPPH y ORAC (Capacidad de absorción de radicales oxígeno) que son los más usados. Es recomendable que al menos dos (o incluso todas) de éstas evaluaciones sean combinadas para obtener un perfil antioxidante más certero del producto en estudio (Pérez y Jara, 2008) dado que distintos compuestos con capacidad antioxidante tienen distintos tipos de afinidad por las especies reactivas del oxígeno (EROs).

Utilizando extracto metanólico de la pulpa del fruto se ha determinado un porcentaje de inhibición de DPPH entre 32% a 82% (Bosmediano y Coronel, 2014), el DPPH es un radical oxidante frecuentemente usado para la evaluación antioxidante mediante su inhibición. Se mencionó anteriormente que la variación geográfica influye en la producción de metabolitos secundarios, por lo que debería también influir en la capacidad antioxidante, esto fue encontrado por Laily y Suranto (2012) donde evaluaron extractos metanólicos del fruto de papaya de monte cultivados a 2400 m., 1900 m. y 1400 m. sobre el nivel del mar, obteniendo capacidad antioxidante con IC₅₀ (capacidad de inhibir el 50% de los radicales oxidantes) de 0,983 mg/100 ml, 1,2945 mg/100 ml y 5,326 mg/100 ml respectivamente. Extractos etanólicos y de la fracción n-hexano de hojas de la planta han mostrado actividad antioxidante con el DPPH IC₅₀ en valor de 30.8 ppm y 157,134 ppm respectivamente en comparación con la vitamina C que es de 2.9 ppm (Indranila y Ulfah, 2015; Mu'awwanah y Ulfah,

2015). En un estudio para evaluar la capacidad antioxidante de bioactivos de frutas nativas peruanas, Repo y Encina (2008) determinaron que el fruto de *V. pubescens* tiene mayor cantidad de compuestos fenólicos que *Solanum betaceum*, *Opuntia ficus-indica* y *Physalis peruviana*, este último presentó además similar concentración de vitamina C, pero el grado de capacidad antioxidante fue mayor evaluando con el método DPPH y ABTS. La identificación de los diferentes compuestos de *Carica pubescens* y la evidencia que su fruto ha demostrado mayor capacidad antioxidante que otras especies importantes en este aspecto (como *P. peruviana* por ejemplo), hace suponer que esta especie es un candidato para generar protección contra el daño reproductivo inducido por ciclofosfamida principalmente atenuando la sobreproducción de EROs y así disminuyendo el estrés oxidativo en el ambiente celular.

Tabla 2

Capacidad antioxidante y contenido de compuestos bioactivos

Componente	Cantidad
DPPH (g trolox/g de tejido)	1936
ABTS (g trolox/g de tejido)	2141
Fenoles totales (mg ácido gálico/100g de muestra)	167
Vitamina C (mg ácido ascórbico/100g de muestra)	31.41

Nota. Repo y Encina (2008)

1.1.7 Usos

Por su alto contenido de papaína, esta fruta tiene gran aceptación en los mercados internacionales para uso en la industria farmacéutica y en la de alimentos como ablandador de carne; estas consideraciones sugieren su cultivo como una alternativa de desarrollo en las zonas más deprimidas de los Andes. (Duque y Morales, 2005)

Es un alimento natural, cuyo fruto es apreciado por su olor característico y agradable, posee altos beneficios por sus cualidades nutritivas, presencia de enzimas, proteínas y vitaminas A, B y C y minerales. (Chávez, 2013)

1.2. Extractos vegetales

Los extractos vegetales se han definido como un concentrado obtenido por tratamiento de productos vegetales con solventes apropiados, tales como agua, etanol o éter, de elementos solubles, constituidos por una mezcla de principios activos y sustancias inertes que se producen de la totalidad o de partes de una planta fresca o seca (Lizcano y Vergara, 2008).

Para aprovechar las sustancias activas de una planta, se recurre frecuentemente a los extractos. El proceso de extracción consiste en incorporar las sustancias activas de una planta a un solvente, que generalmente suele ser agua o alcohol; se puede realizar en frío o en caliente, y el producto resultante puede ser una solución concentrada o espesa en función de la sustancia de origen, o espesarse por propio interés en base a la aplicación que se le vaya a dar (Gonzales, 2004).

1.2.1 Proceso de extracción

Los procesos de extracción más simples empleados se dividen de acuerdo al disolvente utilizado en:

- ❖ Extracción con agua: infusión, destilación por arrastre con vapor de agua y decocción (Gonzales, 2004).
- ❖ Extracción con solventes orgánicos: maceración, lixiviación o percolación, extracción Soxhlet, digestión y por fluido supercrítico (Gonzales, 2004).

1.2.2 Características de los extractos

Estudios realizados por Corpas y Barrero entre 1988 y 1991, permitieron fundamentar las siguientes características específicas de los extractos (Gonzales, 2004):

- ❖ Los extractos bien preparados son de color más o menos oscuros; cuando han sido preparados al vacío, son ligeramente más claros.
- ❖ Algunos son de color café amarillento, otros rojizos; los extractos provenientes de hojas son verdosos debido a la clorofila.
- ❖ Su aspecto debe ser liso, fino y homogéneo.
- ❖ Su olor y sabor son propiedades características de la materia prima que les ha dado su origen. Cuando son mal preparados, adquieren olor a caramelo o confitura poco conocida.
- ❖ La solubilidad de los extractos es variable y está en relación directa con el tipo de preparación al cual fueron sometidos.

Los extractos acuosos son completamente solubles en agua y producen una solución transparente, algunas veces ligeramente turbia, debido a que han sido preparados con mucha anterioridad.

Los extractos alcohólicos son parcialmente solubles en agua y algunas veces son totalmente insolubles, especialmente los extractos que han sido preparados con alcohol fuerte tienen un excelente índice de disolución, en el mismo título alcoholimétrico del alcohol con el cual han sido preparados.

Los extractos alcohólicos preparados con hojas, dan soluciones coloreadas de verde, pues la eliminación de la clorofila no puede ser total (Gonzales, 2004).

1.2.3 Métodos de extracción

Deben obedecer a la información de la naturaleza química de las sustancias, presentes en la planta y al propósito de la investigación. En el caso de búsqueda de sustancias para la comprobación de actividad biológica, la extracción del material vegetal debe hacerse en agua o con solución disotónica (0.9 % NaCl). Frecuentemente se usa la extracción con solventes orgánicos de bajo punto de ebullición (alcohol, acetato de etilo) y de baja reactividad. Algunas veces es conveniente desengrasar el material vegetal con éter de petróleo (extracto etéreo) o hexano. El alcohol es generalmente más eficaz para recuperar la mayoría de los metabolitos secundarios. Los extractos son evaporados bajo presión reducida o liofilizados, en el caso de extracción con agua (Gonzales, 2004).

Los métodos de extracción se basan en las diferentes solubilidades de los diversos compuestos encontrados en el material vegetal, así , para sustancias de baja

polaridad (lípidos) se utilizan como solventes el éter de petróleo y cloroformo; para sustancias de mediana y alta polaridad el acetato de etilo, el etanol y la acetona . Las extracciones pueden hacerse por “extracción continua en soxhlet”, en la cual el material seco se sitúa en una cámara central y el solvente se hace evaporar en caliente, en un recipiente inferior, el vapor del solvente asciende al condensador y gotea sobre el material vegetal. Por “reflujo”, el material vegetal y el solvente se colocan en un balón el cual tiene acoplado un refrigerante, se calienta, el solvente evaporado se condensa y vuelve a mezclarse con el material vegetal. Y por “maceración en frío”, el material se mezcla con el solvente triturado continuamente en frío (Arévalo, 1996).

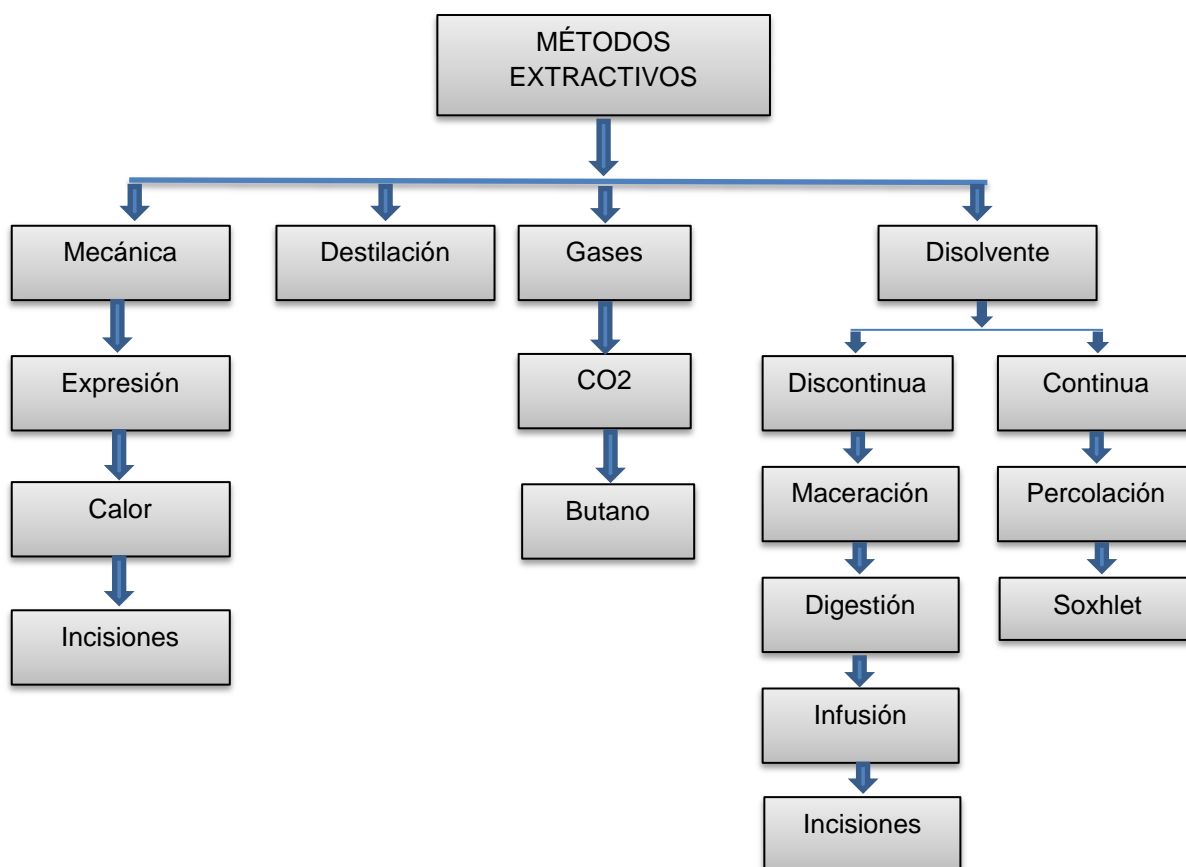


Figura 3 Clasificación de métodos de extracción, Recuperado de Chávez (2013)

1.3. Enzimas proteolíticas

Las enzimas son proteínas que actúan como poderosos catalizadores, moléculas que aceleran una reacción química al reducir su energía de activación. Su característica más llamativa es su elevada especificidad de sustrato, así como su especificidad de acción.

Las enzimas proteolíticas son llamadas también proteasas, proteinasas o peptidasas y se clasifican en grupos o clases por su acción específica. Es así que las enzimas proteolíticas forman parte de un grupo mayor llamado hidrolasas, pues catalizan reacciones de hidrólisis. Este grupo enzimático permite escindir moléculas de alto peso molecular, con enlaces peptídicos, ésteres o glicosídicos, mediante una reacción con moléculas de H₂O.

Las hidrolasas forman parte de procesos metabólicos importantes en los vegetales, hallándose en ellos en forma de proteasas, pectinasas, xilanasas, esterases, poligalacturonidasas y celulasas. De estas, las proteasas o enzimas proteolíticas son las que posiblemente tienen en la actualidad un mayor interés comercial e investigativo, pues constituyen las dos terceras partes de las enzimas que se comercializan en el mundo (Barrett, Rawlings y Woessner, 2004). La mayor parte se origina de fuentes microbianas, sin embargo, la papaína, bromelína y ficina siguen siendo obtenidas directamente de la papaya, piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) e higo (*Ficus carica* L.) respectivamente, y se usan en un gran número de procesos industriales en los cuales no tienen todavía un reemplazo. Obregón (2008) afirma que en actualidad existe un gran número de proteasas vegetales que todavía no han sido aisladas ni caracterizadas.

1.3.1 Clasificación de las enzimas proteolíticas

Las peptidasas se dividen en dos grandes grupos según la ubicación de los enlaces hidrolizados: las endopeptidasas, las cuales rompen uniones peptídicas en distintos puntos al interior de las proteínas y las exopeptidasas, las cuales remueven aminoácidos desde los extremos amino o carboxilo (Obregón, 2008). La clasificación en clanes se basa en la molécula que utiliza la enzima para hidrolizar el enlace peptídico, las mismas que pueden ser: los aminoácidos Serina, Cisteína y Treonina (en las serin, cistein y treonin proteasas) o una molécula de agua (en las aspartil, metalo- y glutamil peptidasas).

Una de las mejores fuentes de referencia acerca de las enzimas proteolíticas y las proteínas que las inhiben es la base de datos MEROPS, la cual describe y clasifica cada una de las peptidasas. Bajo este sistema de clasificación se ha establecido una nomenclatura basada en la estructura jerárquica de cada peptidasa. Además, se les ha asignado una familia en base a las similitudes estructurales que presentan en relación a la secuencia de sus aminoácidos. Las familias que se cree que son homólogas se han agrupado juntas en un clan (Rawlings, Morton, Kok, Kong, Barret, 2008).

Las peptidasas cisteínicas son las proteasas más extensamente estudiadas. Ejemplo de ellas en los vegetales, además de la papaína, son la ficina, la bromelina y la actinidina. En el reino animal también se encuentran presentes, tales como las calpaínas citosólicas en los mamíferos y proteasas de parásitos encontrados en el género Trypanosoma.

1.3.2 Usos medicinales de las enzimas proteolíticas

Las enzimas proteolíticas encontradas en las plantas han sido utilizadas con fines culinarios y medicinales desde tiempos inmemoriales por varias poblaciones alrededor de mundo. Por ejemplo, la ficina del higo se utiliza en Sudamérica como antiparasitario y mucolítico en preparaciones fitoterápicas de uso popular. La bromelina obtenida de la piña al igual que la papaína han sido utilizadas tradicionalmente para tratar inflamaciones y traumatismos, así como coadyuvante en enfermedades respiratorias.

El consumo estas enzimas como suplemento alimentario es cada vez más frecuente debido a la evidencia científica que aumenta progresivamente, y respalda muchos de los usos tradicionales. Esto ha resultado en un aumento en la comercialización internacional de cápsulas y preparados nutricionales de venta libre.

Las propiedades antiparasitarias de estas proteasas vegetales han sido investigadas en múltiples ocasiones, dado su uso tradicional con este propósito en diferentes culturas. Mansur, *et al.* (2014) plantea que se produce por desintegración de las cubiertas externas o tegumentos de los parásitos intestinales del tipo vermes. A pesar de que también se encuentra muy utilizado en la medicina tradicional para prevenir y tratar las amebiasis, no se han realizado todavía suficientes estudios que respalden su eficacia.

Distintos autores concuerdan en que las enzimas proteolíticas vegetales tienen potentes efectos laxantes y digestivos provocados por la propia proteólisis, la cual produce irritación leve de las paredes intestinales y descomposición de los alimentos de origen proteínico que se encuentran en el lumen intestinal. Su efecto tiene relación con la dosis, pues si se utiliza en escasa cantidad, actúa como un digestivo

suave facilitando la ingesta de comidas copiosas, mientras que si se utiliza en grandes dosis, su efecto es laxante.

Existen cada vez más evidencias de su uso seguro y prometedor también en otras enfermedades. Por ejemplo, se ha encontrado que su uso en preparados tópicos o ungüentos cicatrizantes, mejora la curación de heridas y evita la hiperqueratinización de las mismas (Pieper y Caliri, 2003). Hay evidencia de que el consumo de papaína mejora el drenaje de líquidos y evita la inflamación en pacientes postquirúrgicos. En este sentido, la papaína mejora el flujo linfático para prevenir el edema y evitar las adherencias internas por sus propiedades fibrinolíticas (Hellebrekers, Trimbo, Trimbo, Emeis y Kooistra, 2000).

En cuanto al sistema respiratorio, las enzimas vegetales se utilizan de manera tradicional, así como en medicina convencional para fluidificar el mucus depositado en las vías respiratorias, facilitando la expulsión del mismo de senos paranasales, laringe, tráquea y bronquios (Pfizer, 2016)

Se cree que su mecanismo de acción se basa en la hidrólisis de diferentes enlaces peptídicos involucrados en procesos patológicos. Por este motivo, en la actualidad, el uso de enzimas o consumo de plantas que las contengan ha sido estudiado farmacológicamente en diversas afecciones de tipo crónico-degenerativo con un gran impacto social.

Los pacientes que padecen enfermedades reumáticas han reportado un alivio muy importante de su sintomatología, posiblemente asociada a la degradación de proteínas proinflamatorias endógenas (Leipner, Iten y Saller, 2001).

Desser, *et al.* (2001) hallaron en su investigación que la terapia con enzimas proteolíticas por vía oral reduce considerablemente los niveles de TGF- beta1,

citocina que se encontró elevada previamente en pacientes con artritis reumatoide, osteomielofibrosis y herpes zoster.

Sin duda, la hipótesis más interesante, pero todavía en vías de estudio, es el posible efecto anticancerígeno de las enzimas proteolíticas vegetales. Esto se explica porque los tumores se hallan cubiertos por una matriz extracelular conformada por proteoglicanos, ácido hialurónico, colágeno, elastina, laminina y otras proteínas estructurales que restringen la difusión de las drogas antineoplásicas. En el estudio de Parodi, *et al.* (2014), las enzimas proteolíticas aumentaron la difusión de nanopartículas de silica en tumores in vivo e in vitro. Así mismo, teóricamente este mecanismo facilitaría el combate del sistema inmune a los tumores mejorando su acceso al tejido maligno.

1.3.3 Papaína

La papaína es una de las enzimas proteolíticas extraídas del fruto inmaduro de la papaya (*Carica papaya L.*) y otros miembros de la familia *Caricaceae*. Es una proteína que pertenece a la familia de las cisteín-proteasas y está compuesta de 212 aminoácidos que se encuentran enrollados en dos partes separadas por un puente, el cual tiene un lugar activo con un grupo tiol (SH) libre del cual depende su actividad proteolítica. Es una enzima de baja especificidad que hidroliza tanto las proteínas como los péptidos de pequeño tamaño, amidas y ésteres. Preferentemente actúa sobre los aminoácidos básicos Leucina, Glicina, así como sobre Arginina, Lisina y Fenilalanina (Wong, 1995).

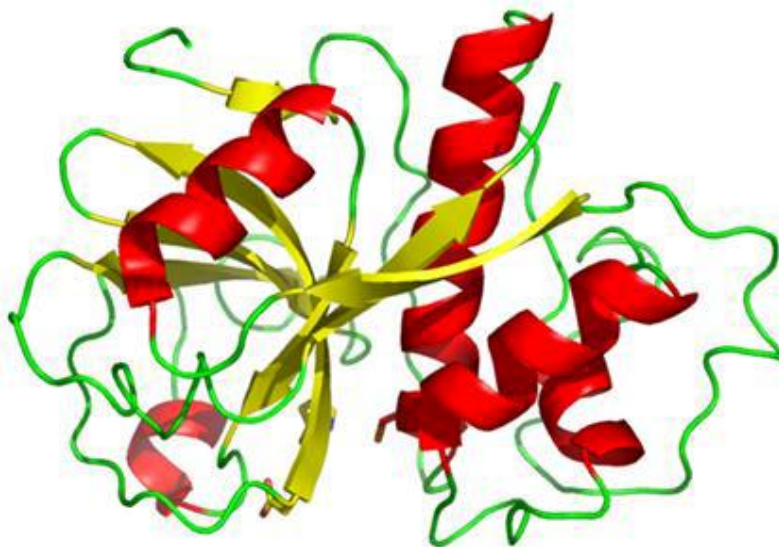


Figura 4 Estructura tridimensional de la papaína, Recuperado de Botanishcher Garten (2016)

La papaína, al provocar la ruptura de múltiples enlaces en proteínas animales y vegetales, tiene importantes usos industriales. En el mercado gastronómico se la utiliza como ablandador de carnes y para evitar la formación de sedimentos proteicos en la cerveza (clarificador). Sus propiedades la hacen irremplazable por algún otro sustituto sintético. (Banchon, 2005).

En la cosmética se la usa como agente exfoliante químico (peeling) que remueve las capas superficiales de la piel.

1.3.3.1 Características fisicoquímicas de la papaína

- ❖ **Activadores:** Es activada por el aminoácido cisteína, el tiosulfato y el glutatión. Es inhibida o inactivada por iones metálicos (Zn, Cd, Fe, Pb), oxidantes (H_2O_2 , radicales libres, etc.) y por agentes que reaccionan con los tioles (ácido ascórbico).

- ❖ Su actividad proteolítica puede ser medida de distintas maneras. Una de las unidades más usadas es: PU/U/USP= unidades de papaína, cantidad de enzima que libera el equivalente a 1 µg de tirosina por hora bajo condiciones de laboratorio.
- ❖ Actividad óptima: Esta enzima presenta su mejor actividad en un pH de 5,0 a 7,0 y a una temperatura de 65°C.
- ❖ Peso molecular: de 23,406 Da
- ❖ Solubilidad y estabilidad en soluciones: papaína es soluble en agua a 10 mg/ml. Inmediatamente antes de realizar su valoración sobre su actividad proteolítica, la enzima debe ser diluida en un buffer que contenga 5mM L-cisteína. Los agentes estabilizantes incluyen EDTA, cisteína y dimercaptopropanol. Como las soluciones de papaína son estables en diferentes rangos de temperatura, la estabilidad depende del pH circundante. Las soluciones son inestables en un medio ácido. Con un pH menor a 2,8 las soluciones pierden una parte significativa de su actividad. La pérdida de la actividad de la enzima en una solución es de alrededor de 12% por día, probablemente como resultado de autólisis y/u oxidación. Las soluciones de papaína son estables frente a varios agentes desnaturizantes, por ejemplo, su actividad completa se mantiene después de la recristalización en metanol al 70% y en soluciones de urea 8 M. Sin embargo, hay una pérdida significativa de su actividad cuando la papaína es expuesta a ácido tricloroacético al 10% o a clorhidrato de guanidina a 6M (Mundo y Serrano, 2012; Sigma-Aldrich, 2015)

1.3.3.2 Biodisponibilidad de la papaína

La biodisponibilidad oral y la efectividad de las enzimas proteolíticas tales como tripsina, quimotripsina, papaína y bromelina han sido discutida desde su introducción al mercado como suplementos con actividad anti-inflamatoria, anti-edematosa e inmunoestimulante.

Una de las mayores razones para esta controversia tiene relación con la susceptibilidad de las enzimas proteolíticas en el medio gástrico. Sin embargo, a pesar de que en muchos casos sí existe una degradación ante un pH tan bajo como el encontrado en el estómago, existen proteinasas que son estables aún dentro de este entorno.

Actualmente, dentro del proceso de estudio de la biodisponibilidad oral de estas enzimas vegetales persiste el debate, pues existen reales dificultades en su valoración in vivo. En sangre las enzimas proteolíticas se unen a antiproteinasas y por lo tanto son difíciles de cuantificar con pruebas inmunológicas y enzimáticas que tienden a subestimarse; lo contrario sucede con los métodos radioquímicos, en los cuales su contenido tiende a sobreestimarse. No obstante, la cuantificación como un parámetro objetivo es fundamental para cualquier estudio de biodisponibilidad. Independientemente de estas dificultades analíticas, hoy en día se acepta que las enzimas proteolíticas cuando son administradas oralmente al ser humano pueden ser detectadas en el plasma sanguíneo y la linfa intactas como moléculas de alto peso molecular y proteínas fisiológicamente activas. (Kolac, Streichhan y Lehr. 1996). Lo mismo sucede con péptidos y moléculas grandes de proteínas, varias investigaciones han confirmado que pasan a través de la barrera mucosa del tracto gastrointestinal (Lorkowski, 2012).

Usando monocapas de células Caco-2 como modelo, se hicieron algunos progresos para comprender mejor el mecanismo por el cual las moléculas grandes atraviesan la barrera intestinal. Las enzimas proteolíticas tripsina, quimotripsina, papaína y bromelina administradas sin recubrimiento entérico disminuyeron la resistencia eléctrica transepitelial y al mismo tiempo aumentaron el transporte de marcadores fluorescentes que normalmente no son transportados a través de la monocapa de células Caco-2. Los resultados sugieren que las enzimas proteolíticas son capaces de aumentar la permeabilidad de la mucosa y del epitelio, y por lo tanto, facilitar su propia absorción por un mecanismo de difusión paracelular auto-mejorada. (Kolac, et al. 1996). Este mecanismo de transporte paracelular resulta de la concentración sub-nanomolar de moléculas de proteasa que se encuentran libres transitoriamente o en un complejo con anti-proteasas en concentraciones más altas. (Lorkowski, 2012).

Los datos de investigaciones farmacocinéticas revelan linealidad de dosis para los niveles plasmáticos máximos de proteasas y una alta variabilidad interindividual. Se ha encontrado que la absorción sigue una farmacocinética inusual en todos sus pasos, incluyendo la eliminación, debido a una velocidad lenta de absorción y una rápida unión al 100% a anti-proteasas. El empleo oral de proteasas conduce a un aumento de la actividad proteolítica en suero y un aumento de las concentraciones plasmáticas de las correspondientes anti-proteasas. Su actividad biológica se determina por su actividad proteolítica como proteasas libres en péptidos solubles/proteínas o receptores de membrana celular (por ejemplo, receptores de la proteasa activada) y su actividad se establece mediante el complejo formado con anti-proteasas específicas y/o inespecíficas. Los complejos anti-proteasa durante las reacciones inmunes y las lesiones corporales se asocian frecuentemente con diferentes citoquinas y factores de crecimiento que luego se eliminan de los fluidos

corporales y los tejidos mediante endocitosis mediada por receptores en los hepatocitos y células sanguíneas. (Lorkowski, 2012).

1.3.3.3 Panorama de la producción de papaína en el mundo

Como se mencionó anteriormente, la papaína se utiliza en muchas industrias para diversos usos. Algunos de los usuarios finales son fábricas de cerveza, productos farmacéuticos y medicinales, alimentos, cuero, detergentes, procesamiento de carne y pescado, etc. La mayoría de estas industrias están creciendo en todo el mundo. La papaína de buena calidad o altamente purificada tiene una gran demanda de exportaciones también. A pesar de poder obtener buenas cantidades de papaína en la región y la gran demanda que existe, aún no se presenta un repunte de esta industria en Sudamérica y, por lo tanto, existen buenas perspectivas para las nuevas empresas productoras. Las principales empresas distribuidoras se encuentran en Europa y EEUU, y redistribuyen la enzima a otros países como artículo final procesado o como parte de un producto terminado. El número de compañías involucradas en la compra primaria es relativamente pequeño y todas tienen sus proveedores particulares. La mayor parte de consumidores de papaína lo hacen en grandes cantidades, tanto a nivel nacional como internacional. (Fernández, 2005).

La enzima tiene una gran demanda en el mercado internacional, esencialmente en el Reino Unido, EE.UU., Europa y los países del Golfo. El mercado de alimentos y farmacéutico de la papaína muestra un buen potencial de expansión en el futuro el mismo que está creciendo en un 3% a 5 % anual. (Krishnaiah, Awang, Rosalam y Buhri, 2002). Se calcula que el tamaño del mercado es de 900 y 1000 toneladas métricas de producción de papaína al año. No obstante, es importante conocer que

existe una brecha de producción de papaína altamente refinada, la cual se estima que está alrededor de 100 toneladas métricas de producción anual. Los principales productores mundiales de papaína altamente refinada son los siguientes países: Uganda, Tanzania, República Democrática del Congo, India, China y Brasil. (Fernández, 2005). La papaína altamente refinada tiene un valor aproximado en el mercado de 100 USD\$ por kilogramo.

II. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Área de ejecución

Localidad

Distrito de Cutervo - Provincia de Cutervo – Departamento de Cajamarca

Distrito de Lambayeque –Provincia de Lambayeque –Departamento de Lambayeque

Institución

Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo – Facultad de Ingeniería Química e Industrias Alimentarias – Laboratorios de Tecnología de alimentos, fisicoquímica y química orgánica de la Sede y Laboratorios de la Filial de Cutervo.

2.2. Tipo de investigación

Investigación experimental y básica.

2.3. Población y muestra

2.3.1. Población

Producción de gualaongo del centro poblado de Raime – distrito y provincia de Cutervo – Departamento de Cajamarca.

2.3.2. Muestra

Constituida por 10 kg de gualaongo adquiridos del centro poblado Raime.

2.4. Variables

2.4.1 Variables independientes

Concentración de etanol (76%, 86% y 96%)

2.4.2 Variables dependientes

Rendimiento (ver tabla 14).

Tabla 3

Operacionalización de Variables independientes y dependientes para el estudio del efecto de la concentración del etanol en el rendimiento de extracción de papaína a partir de gualacongo (Vasconcellea pubescens)

VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES	ÍNDICE
V. Independiente	Concentración de etanol	76, 86, 96	Porcentaje
V. Dependiente	Cantidad de extracto de papaína	Rendimiento (%) de papaína	Mg/100g de muestra

Nota. Elaboración propia (2019)

2.5. Instrumentos de recolección de datos

2.5.1. Equipos e instrumentos de laboratorio

- ❖ Balanza electrónica de precisión marca OHAUS Modelo Ap2103 sensibilidad 0,001g, capacidad 300 g.
- ❖ Balanza de precisión marca EXCELL, sensib. 0,01 g y capacidad 300 g.
- ❖ Balanza semianalítica marca OHAUS sensib. 0,1g y capacidad de 300 g.
- ❖ Balanza de gramos marca HENKEL modelo BCE30, sensibilidad 5 g y capacidad 30 kg.
- ❖ Baño maría marca MEMMERT, rango de temperatura 0° a 95°C.
- ❖ Espectrofotómetro marca UNICO, EE.UU. Vis-UV.
- ❖ Centrifugadora electrónica marca BOECO GERMANY, 0-6000 rpm.
- ❖ Bomba de vacío de membrana/compresor AIRJET mini, 100 mbar.
- ❖ Estufa marca MEMMERT 230°C.
- ❖ Mufla THERMOLYNE tipo F48010-33.

- ❖ Potenciómetro rango 0 a 14 digital Marca HANNA
- ❖ Refractómetro digital 0 – 32 % Marca HANNA.
- ❖ Refractómetro a mano 0 - 30%.
- ❖ Licuadora marca OSTER 4655,3 velocidades.
- ❖ Congeladora FAEDA.
- ❖ Refrigerador LG y Cocina semi-industrial.

2.5.2. Materiales

- ❖ Baguetas de vidrio.
- ❖ Buretas PYREX 25 y 50 ml.
- ❖ Cisoles de porcelana 50, 100 ml.
- ❖ Embudos buchner y de vidrio de 10 cm de diámetro.
- ❖ Fiolas 50, 100, 250 y 500 ml.
- ❖ Gradillas de madera y/o metálicas.
- ❖ Kitasatos marca PYREX 250 ml.
- ❖ Matraces Erlenmeyer marca PYREX 100, 250 y 500 ml
- ❖ Morteros y pilones de porcelana.
- ❖ Tela organza.
- ❖ Pipetas de vidrio 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10 ml.
- ❖ Probetas de vidrio 10, 100 y 250 ml.
- ❖ Picetas de 1 l.
- ❖ Soporte universal con porta bureta.
- ❖ Termómetro 0 – 150 °C, marca BOECO Germany.
- ❖ Tubos de plástico para centrífuga de 15 ml.
- ❖ Cuchillos de acero inoxidable de mango blanco N° 6.
- ❖ Ollas de acero inoxidable 5, 10, 20 Litros.

- ❖ Vasos de precipitación PYREX 50, 100, 250, 600 y 1000 ml.
- ❖ Bolsas de polietileno de alta densidad 500 y 1000 ml.
- ❖ Papel aluminio.

2.5.3. Materiales de escritorio

- ❖ Borradores
- ❖ Lapiceros
- ❖ Cartuchos de tinta
- ❖ Hojas bond
- ❖ USB

2.5.4. Reactivos y soluciones

- ❖ Agua destilada.
- ❖ Alcohol de 96° (G.L).
- ❖ Carbonato de sodio QP (100%).
- ❖ Hidróxido de sodio 1 N.
- ❖ Solución de Fenolftaleína al 1%.
- ❖ Reactivo de Folin Ciocalteu marca Merck.
- ❖ Estándar de Ácido gálico marca Merck.
- ❖ DPPH free radical marca Merck

2.5.5. Instrumentos para la recolección de datos

- ❖ Formatos de evaluación sensorial
- ❖ Cámara fotográfica
- ❖ Computadora personal
- ❖ Impresora

2.5.6. Método de análisis

2.5.6.1. Análisis físico químico

Los métodos que se emplearon durante el desarrollo del presente trabajo de investigación, se presentan en la tabla 4, cabe mencionar que el detalle de los pasos que sigue cada método se presenta en el anexo 2.

Tabla 4

Métodos de análisis físico químicos

Análisis fisicoquímico	Fórmula	Norma
Humedad	$\%HUMEDAD = \frac{P_2 - P_3}{P_2 - P_1} \times 100$	Método AOAC 925.10, 2005. AOAC 935.36, 18th Ed
Ceniza	$\%CENIZAS = \frac{C_3 - C_1}{C_2 - C_1} \times 100$	Método AOAC 923.03, 2005 AOAC 935.39, 18th Ed.
Proteínas	$\%N = \frac{14 \times N \times V \times 100}{m \times 1000}$ $\%PROTEINA = \frac{14 \times N \times V \times 100 \times FACTOR}{m \times 1000}$ <p>V= 50 ml H₂SO₄ 0.1 N - gasto NaOH 0.1 N o gasto de HCl 0.1 N</p> <p>m= masa de muestra, en gramos</p>	Método AOAC 2001.11, 2005
Grasa	$\%GRASA\ CRUDA = \frac{m_2 - m_1}{m} \times 100$ <p>m = peso de la muestra</p> <p>m₁ = tara de matraz solo</p> <p>m₂ = peso matraz con grasa</p>	Método AOAC 920.85, 2005
Acidez	$\%ACIDEZ\ (como\ ácido\ sulfurico) = \frac{V_s - N_s}{P_m} \times 4.9$	Método de acidez titulable con NaOH 0,1 N y expresada como ácido cítrico (%), AOAC (1995)
Fibra	$\%Fibra = \left(\frac{P_2 - P_3}{P_1} \right) \times 100$ <p>P1= peso de la muestra (g)</p> <p>P2= peso de la muestra insoluble (g)</p> <p>P3= peso de las cenizas</p>	NTP 205.003:1980 reemplazada por la NTP 205.003:2016

Nota. Elaboración propia (2019)

2.6. Metodología Experimental

2.6.1. Caracterización de la Materia Prima

2.6.1.1. Características biométricas

Se empleó 40 frutos para medir su largo con ayuda de un vernier desde la unión del pedúnculo al extremo distal del fruto. Con una balanza digital se evaluó el peso de cada. Anexo 1.

2.6.1.2. Análisis físico químico

Los análisis para la caracterización del gualacongo, se muestran en la tabla 4 enunciando sus respectivos métodos, normativa y/o referencia y fundamentos. Los valores obtenidos de la caracterización fisicoquímica del gualacongo son el resultado promedio de tres repeticiones \pm su desviación estándar.

2.6.2. Acondicionamiento del gualacongo para evaluación de los tratamientos

A continuación, se detalla el proceso seguido para la obtención del extracto enzimático y evaluación de los tratamientos:

❖ Recepción de la materia prima

La materia prima fue recibida procedente del centro poblado Raime, evitando la presencia de materia prima con signos de deterioro (microbiológico y físicos).

❖ Lavado 1

Se utilizó agua potable para el lavado de la fruta eliminando toda materia extraña conteniente que se haya adherido durante su crecimiento y cosecha.

❖ **Desinfección**

Se desinfectó empleando una solución de hipoclorito de sodio de 30ppm para minimizar la presencia de la carga microbiana.

❖ **Lavado 2**

En este segundo lavado se empleó agua potable, tiene como fin eliminar el remanente de hipoclorito de sodio que aun esté presente en la fruta que ya paso por el proceso de desinfección.

❖ **Fraccionamiento**

Utilizando un cuchillo de acero se procedió a fraccionar la fruta con cáscara, pulpa y corazón, mediante incisiones longitudinales.

❖ **Trituración**

La materia fraccionada fue triturada en una licuadora.

❖ **Adición de solvente orgánico**

Se midió el volumen de pulpa obtenido y se multiplicó el volumen resultante por 1,5 ml y el resultado será la cantidad de etanol (76%, 86% y 96%) que se añadió, para cada tratamiento.

❖ **Congelación**

La mezcla anterior se colocó en frascos cerrados de 50 ml, las muestras obtenidas fueron colocadas a -10°C durante 7 días.

❖ **Filtración**

Se filtró utilizando una tela holganza para la separación de sólidos y líquido.

❖ **Centrifugación**

Proceso que se efectuó a 4500 rpm durante 20min.

❖ **Secado en la estufa**

Las muestras extraídas se colocaron en capsulas de porcelana a 40°C por 48 horas en la estufa, siempre controlando la temperatura del equipo.

❖ **Molienda**

Las muestras secas se procedieron a moler con un pilón en el mortero hasta obtener un polvo completamente pulverizado.

❖ **Almacenamiento**

El polvo obtenido se debe de almacenar en frascos cerrados y se colocó en refrigeración a 5°C. Así mismo se evaluó el rendimiento de cada tratamiento.

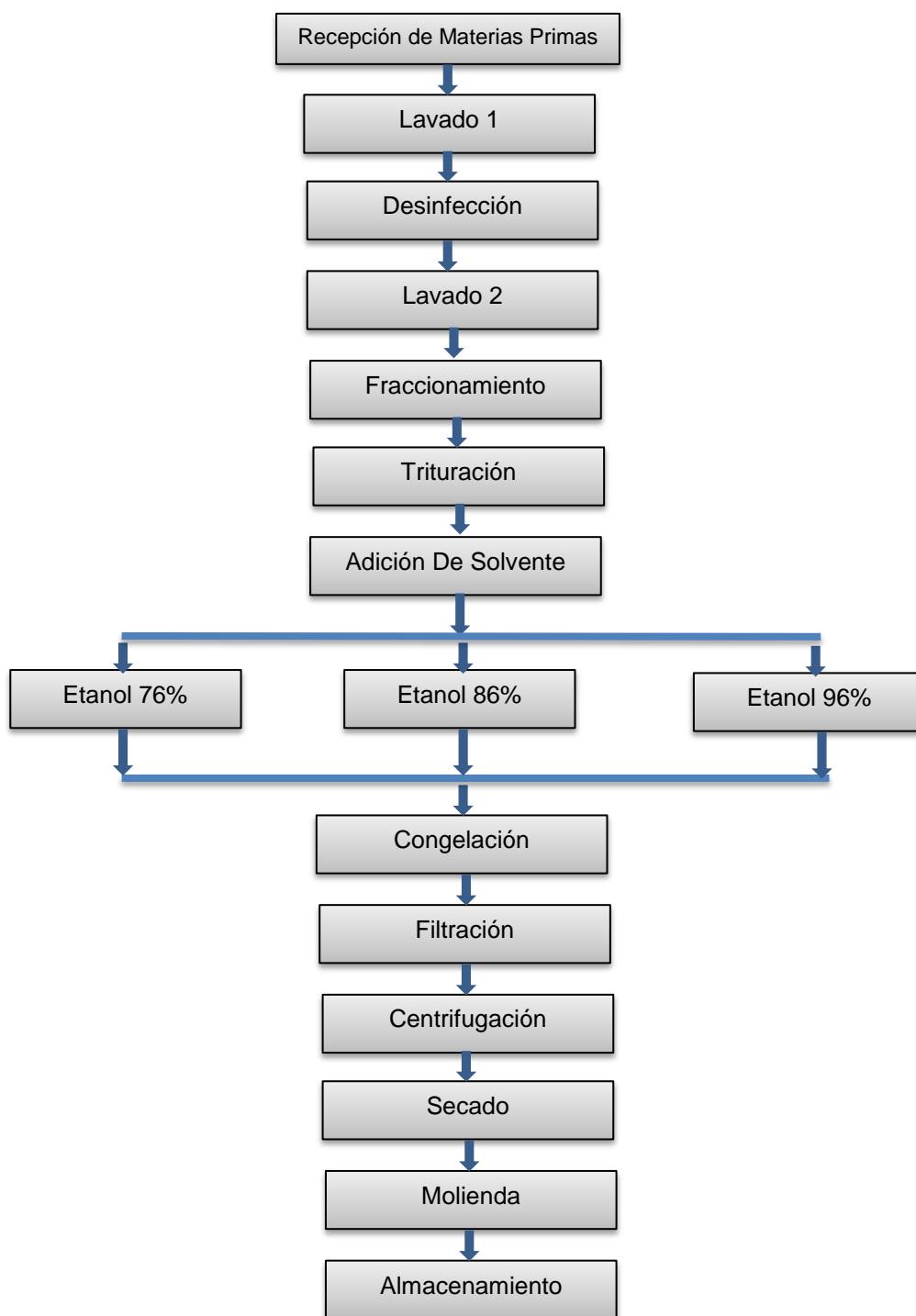


Figura 5 Flujo de operaciones para la obtención de extracción de papaína a partir de gualaongo (*Vasconcellea pubescens*), Elaboración propia (2019)

2.6.3. Evaluación del rendimiento y caracterización del producto obtenido

2.6.3.1. Evaluación del rendimiento

Se evaluó utilizando la siguiente ecuación:

$$Rendimiento (\%) = \frac{\text{Peso de extracto obtenido (g)}}{\text{Peso de materia prima (g)}} \times 100$$

2.6.3.2. Caracterización del producto obtenido

Para la caracterización del concentrado de papaína se determinó el porcentaje de humedad y de materia seca con la aplicación de las siguientes fórmulas.

$$\% \text{ de Humedad} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100$$

Donde:

m_1 = Peso inicial de la muestra

m_2 = Peso final de la muestra

$$\% \text{ de materia seca} = 100 - \% \text{ de humedad}$$

2.6.4. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de la evaluación de los tratamientos fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza de 95% y una prueba de Tukey para determinar la diferencia existente entre las formulaciones. Se empleó el software estadístico SPSS versión 23.

El modelo estadístico que se siguió fue un modelo de diseño experimental al azar completamente aleatorizado.

$$E_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

E_{ij} = Variable respuesta observada

μ = Media general

α_i = Efecto del i-ésimo nivel

ε_{ij} = Error experimental asociado a la ij-ésima variable experimental.

Tabla 5

Análisis de varianza para los tratamientos

F.V.	G.L.
Tratamientos	2
Error	27
Total	29

Nota. Elaboración Propia (2019)

III. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. Caracterización de la materia prima

3.1.1. Características biométricas

El análisis biométrico del fruto de papayita de monte realizado se muestra en la Tabla 6, siendo datos promedios evaluados a partir de 40 frutos (Anexo 1).

Tabla 6

Características biométricas del fruto de gualacongo (Vasconcellea pubescens)

Características	Valor promedio
Peso (g.)	166,74
Longitud (cm)	9,25
Diámetro (cm).	11,34

Nota. Elaboración propia (2019)

En la caracterización biométrica se observó que el peso promedio del fruto de gualacongo fue de 166,74g; longitud 9,25 cm y ancho x 11,34 cm; valores que se encuentran por debajo del promedio presentado por López (2010), quien reporta valores promedios de 172 g de peso, 9,7cm de longitud y 6,38 cm de radio.

3.1.2. Análisis fisicoquímico

En la Tabla 7, se muestra los análisis que se realizaron al fruto de gualacongo, cuyos resultados son promedios de tres repeticiones por análisis.

Tabla 7

Resultado del análisis fisicoquímico del gualacongo

Análisis	Gualacongo
Humedad, %	81,9
Proteína Total (N*6,25), %	1,99
Grasa, %	2,1
Fibra cruda, %	1,25
Ceniza, %	0,5
Carbohidratos, %	12,66
Acidez, % de ácido cítrico	0,84
pH	4,4
Sólidos solubles totales, °Brix	6,0
Índice de madurez, (°Brix/acidez total)	7,14
Valor calórico, kcal	77,5
Valor nutritivo	8,89

Nota. Elaboración propia (2019)

En la Tabla 7, se observa que el gualacongo (*Vasconcellea pubescens*) fresco presentó: pH 4,4; % de acidez 0,84; índice de madurez 7,14; humedad 81,9% y 6,0 °Brix. Salón (2013), determinó: pH 4,2; % de acidez 0,9; índice de madurez 5,77; humedad 95,81 % y 5,2 °Brix. Se observa una ligera diferencia en los resultados; Concha, Guevara y Araujo (2002), justifica que “la variación en el contenido de proteína está relacionada fundamentalmente con el método de análisis empleado, condiciones establecidas para llegar a obtener la muestra y la variedad de muestra analizada”. Concha, *et al* (2002), determinó: humedad 90,49 %, pH 4,5; %de acidez

total 0,37; índice de madurez y °Brix 16 y 6, respectivamente. Esta diferencia en el % de acidez total puede ser debido a la procedencia e índice de madurez del gualacongo. Para la extracción de la papaína fue necesario considerar el estado de madurez de la fruta (Gutiérrez y Velásquez, 2009). Así también Mamani y Quiroz (2017), menciona que la variación en los resultados puede deberse al distinto origen de cultivo y diferencia de suelos, aunque sean frutas de la misma variedad.

Tabla 8

Estadísticos descriptivos para los análisis fisicoquímicos del gualacongo

	N	Mínim o	Máxim o	Media	Desviación estándar
Agua	10	80,80	82,80	81,9000	± 0,89194
Proteínas	10	1,80	2,17	1,9900	± 0,13856
Grasa	10	1,98	2,43	2,2000	± 0,17901
Carbohidratos	10	12,80	14,02	13,3100	± 0,53435
Cenizas	10	0,51	0,70	0,6000	± 0,07348
Fibra	10	1,10	1,36	1,2500	± 0,08781
Acidez	10	0,53	0,55	0,5400	± 0,00816

Nota. Elaboración propia (2019)

3.2. Evaluación de los tratamientos

3.2.1. Obtención del extracto enzimático

Los frutos de *Vasconcellea pubescens* fueron adquiridos del centro poblado Raime – distrito y provincia de Cutervo – Departamento de Cajamarca, Perú.

Los frutos seleccionados fueron aquellos con características sensoriales agradables y sin daño físico, con pulpa y piel en buen estado, tal como se muestra en el anexo 2. Para preparar los extractos, los frutos de la especie vegetal fueron desinfectados con solución de hipoclorito a una concentración de 30 ppm y cortados verticalmente, se les retiró la capa mucilaginosa interna y las semillas; posteriormente fueron cortados en trozos de aproximadamente 2 cm³ y triturados mecánicamente en una licuadora por 1 minuto aproximadamente para obtener partículas pequeñas y homogéneas. El fruto triturado fue mezclado con los diferentes niveles de etanol (76°, 86° y 96° de etanol en una proporción de 1:1,5 y fue macerado en frascos herméticos por 7 días realizándose agitaciones esporádicas. Se recuperó la fracción líquida del macerado y se filtró con tela organza. La solución filtrada fue centrifugada a 4500 rpm por 20 minutos y lo obtenido fue colocado en placas para luego ser ubicados en la estufa a aproximadamente 40 °C hasta que se evapore el alcohol, que se da aproximadamente en 48 horas. El material deshidratado fue triturado en un mortero y almacenado a 5°C.

Tabla 9

Rendimientos de la extracción de papaína a diferentes niveles de etanol

Nivel de etanol	Porcentaje de Rendimiento
76°	5,19
86°	5,46
96°	6,29

Nota. Elaboración propia (2019)

Evaluación estadística de los resultados

H_0 : Las medias de las muestras de rendimiento de papaína son Iguales

H_1 : Las medias de las muestras de rendimiento de papaína no son Iguales

Nivel significancia de $\alpha = 0,05$

Primero comprobaremos la homogeneidad de varianza

Donde

H_0 : No existe diferencia entre las varianzas

H_1 : Existe diferencia entre las varianzas

Tabla 10

Homogeneidad de varianza para rendimiento de papaína

Prueba de homogeneidad de varianzas

Porcentaje de papaína

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
1,489	2	27	0,244

Nota. Elaboración propia (2019)

La tabla 10 que contiene el estadístico de Levene nos permite contrastar la hipótesis de igualdad de varianzas poblacionales. Donde observamos que el nivel crítico (sig.) es mayor que 0,05, por lo tanto debemos aceptar la hipótesis de igualdad de varianzas.

Tabla 11

Pruebas de efectos inter-sujetos para variable rendimiento de papaína

ANOVA

Porcentaje de proteína

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	6,573	2	3,286	334, 329	0,000
Dentro de grupos	0,265	27	0,010		
Total	6,838	29			

Nota. Elaboración propia (2019)

Regla de decisión

Si el valor p (Sig.) es menor que α , entonces se rechaza H_0 .

Por lo tanto, Como el nivel de significancia es menor que el 5%, entonces se rechaza la H_0 , se concluye que el factor (concentración de etanol) influye en la variable dependiente (porcentaje de proteína), es decir, los distintos niveles del factor producen distintos efectos en el rendimiento del producto obtenido. Quiere esto decir que habrá que estudiar entre qué niveles se dan esas diferencias significativas.

Tabla 12

*Prueba de comparaciones múltiples para variable rendimiento de papaína***Comparaciones múltiples**

Variable dependiente: Porcentaje de proteína

HSD Tukey

(I) Concentración de etanol	(J) Concentración de etanol	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
76°	86°	-,270 [*]	,044	,000	-,38	-,16
	96°	-1,100 [*]	,044	,000	-1,21	-,99
86°	76°	,270 [*]	,044	,000	,16	,38
	96°	-,830 [*]	,044	,000	-,94	-,72
96°	76°	1,100 [*]	,044	,000	,99	1,21
	86°	,830 [*]	,044	,000	,72	,94

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Nota. Elaboración propia (2019)

En este caso hay que interpretar la columna de significación, si esta es menor o igual que 0,05; por lo que se observa en la tabla 12 existen diferencias significativas entre todos los tratamientos.

Tabla 13

Prueba de comparación de medias de tukey para subconjuntos homogéneos

Porcentaje de proteína				
HSD Tukey ^a				
Concentración de etanol	N	Subconjunto para alfa = 0,05		
		1	2	3
76°	10	5,19		
86°	10		5,46	
96°	10			6,29
Sig.		1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 10,000.

Nota. Elaboración propia (2019)

Como resultado de la comparación de medias podemos observar que existen diferencias entre los tres tratamientos, siendo el tratamiento con 96° de etanol el más significativo.

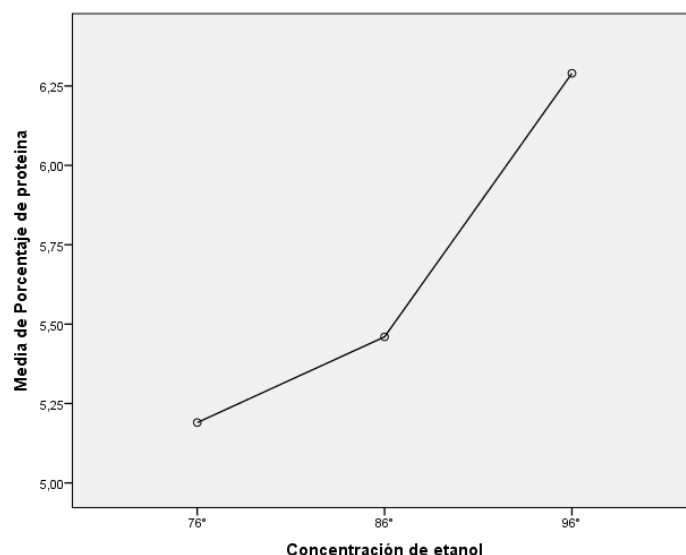


Figura 6 Comparación de medias para el rendimiento de papaína, Elaboración propia (2019)

Como se puede observar en la tabla 10 para la extracción se evaluaron 3 niveles de etanol. La adición de un solvente orgánico (etanol o acetona) produce agregados de moléculas proteicas que tienden a precipitar, esto se debe a que el solvente presenta una constante dieléctrica menor que la del agua, lo cual produce un incremento en las fuerzas de atracción entre cargas opuestas y una disminución en el grado de ionización de los radicales de las proteínas, y en consecuencia una disminución en la solubilidad de ésta (Tébar, 2009).

Todas las soluciones permitieron extraer la proteína deseada en la solución y su precipitación tras el proceso de centrifugación; se obtuvo mayor cantidad de precipitado con un nivel de etanol de 96°, debido a que el efecto de precipitación será mayor a mayor concentración del solvente.

3.3. Caracterización del extracto seleccionado

En la tabla 14, se observa la caracterización de la mejor concentración de etanol (96°) para la extracción de papaína a partir de gualacongo.

Tabla 14

Caracterización del extracto de papaína a partir de gualacongo utilizando como solvente etanol 96°

DESCRIPCIÓN	Valor, %
Humedad, %	6,82
Materia seca, %	93,18
Nota. Elaboración propia (2019)	

IV. CONCLUSIONES

1. Se evaluó adecuadamente el efecto de la concentración de etanol en el rendimiento de extracción de papaína a partir de gualaongo, obteniéndose un rendimiento de 6,29% con etanol a 96° GL.
2. Se caracterizó biométricamente al gualaongo obteniéndose los valores promedios de: longitud 9,25 cm, diámetro 11,34 cm y peso 166,74 g.
3. La pulpa de gualaongo presento las siguientes características fisicoquímicas: humedad 81,9%, proteína 1,99%, grasa 2,1%, fibra cruda 1,25%, ceniza 0,5%, carbohidratos 12,66%, acidez 0,84%, pH4,4, sólidos solubles 6° Brix, índice de madurez 7,14, valor calórico 77,5 kcal y valor nutritivo 8,89.
4. La concentración de etanol que permitio la mayor extracción de papaína fue la de 96° GL, con un rendimiento del 6,29%.
5. El extracto de papaína presento 6,82% de humedad y 93,18% de materia seca.
6. Con la presente investigación se demostro que el fruto de gualaongo puede ser una altermnativa para la extracción de papaína, en el mercado creciente de ablandadores de carne.

V. RECOMENDACIONES

1. Emplear otros solventes (sales o acetona), buscando mayor rendimiento en la extracción de enzimas.
2. Realizar investigaciones referentes a la extracción de enzimas del látex del gualaongo y comparar con el contenido de las mismas en la pulpa.
3. Investigar otros vegetales leñosos que puedan ser fuente de enzimas de aplicación alimentaria.
4. Estudiar la aplicación del extracto enzimático (papaína) en la aplicación del ablandamiento de carnes.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Acosta-Solís, M. (1992). Vademécum de Plantas Medicinales del Ecuador. 1ra Edición, Quito (Ecuador), Editorial FESO.
- Arévalo, E. (1996). Determinación de la actividad antimicrobiana (bacterias, hongos y levaduras) de algunas especies de Espeletias encontradas en el páramo de Guasca. Carrera Bacteriología. Facultad de Ciencias Básicas. Departamento Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. Pags 124
- Atalaya, R. (2017). Obtención de un filtrante de papayita de monte (*Carica pubescens*) utilizando dos técnicas de secado y diferentes partes del fruto. Tesis de pre grado. Un Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas. Chachapoyas - Amazonas. Perú.
- Badillo, V. (1971). Monografía de la Familia Caricaceae. Maracay: Universidad Central de Venezuela.
- Balbontín, C. (2007). Treatment with 1-MCP and the role of ethylene in aroma development of mountain papaya fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 2007, vol. 43, no 1, p. 67-77.
- Banchon, C. (2005). Universidad de Guayaquil. Facultad de Ingeniería Química. Inmovilización de papaína en soporte de quitosano, <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/413/1/TESIS%20955.pdf> [Leído: 11 de agosto de 2014, 22:00 GMT-3].
- Barrett, A., Rawlings, N., y Woessner, J. (2004). *Handbook of Proteolytic Enzymes* (2nd. Ed.), Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra.

- Bernal, H. y Correa, J. (1990). Especies promisorias de los países de convenio Andes Bello. Tomo IV. Editorial Guadalupe. Bogotá, Colombia. 268-300.
- Bosmediano, E. y Coronel, J.. (2014). Efectos del procesamiento de productos derivados del chamburo en la actividad antioxidante. Tesis Doctoral. Universidad de Guayaquil. Facultad de Ingeniería Química.
- Botanishcher G. (2016). Carica papaya - der Melonenbaum. <https://www.botanik.kit.edu/garten/636.php>. [Leído: 11 de agosto de 2014, 22:00 GMT-3].
- Castilla, C. (2016). Determinación del efecto antibacteriano in vitro del extracto de hojas de *Carica pubescens* L (Caricaceae) “papaya arequipeña” frente a bacterias patógenas. Tesis de grado. Universidad Nacional de San Agustín. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Arequipa. Perú.
- Chaiwut, P. y Kanasawud, P. (2007). “Solid-to-solid peptide synthesis by glycy l endopeptidase”. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 2007.
- Chávez, D. (2013). Efecto bactericida In Vitro de la solución del extracto estabilizado de *Carica Pubescens* (Papaya Arequipeña) al 2%, del gluconato de clorhexidina al 2% y del hipoclorito de sodio al 5%, sobre el crecimiento del *enterococcus faecalis* en diferentes tiempos. Universidad Católica De Santa María. Arequipa.
- Concha, J; Guevara, A y Araujo, M. (2002). Obtención de Polvo de Papaya de monte (*Ca rica Pubescens*) por atomización *Revista Ingeniería U C*, Vol. 9, N° I. Junio.

- Cornish-Bowden, A. (1995). Analysis of enzyme kinetic data. Oxford: Oxford University Press, 1995.
- Desser, L., Holomanova, D., Zavadova, E., Pavelka, K., Mohr, T. y Herbacek, I., (2001). Oral therapy with proteolytic enzymes decreases excessive TGF-beta levels in human blood. Cancer Chemother Pharmacol. Jul;47 Suppl:S10-5.
- Dietrich, C., Beuerle, T., Withopf, B., Schreier, P., Brunerie, P., Bicchi, C. y Schwab W. (1997) Agric Food Chem.
- Duke, J. y DuCellier. J (1993). CRC handbook of alternative cash crops. Boca Raton, FL: CRC Press, 1993.
- Duque, C. y Morales, A. (2005) El aroma frutal de Colombia Univ. Nacional de Colombia. P 135-155.
- Espinosa, I. (2016). Germinación, microinjertación y cultivo de callos in vitro de *Vasconcellea stipulata* V. M. Badillo y *Vasconcellea pubescens* A.DC. Trabajo de investigación. Universidad Nacional de la Plata - Ecuador.
- Fernández, J., (2005). Plan de negocio para la producción de papaína en la séptima región. Tesis de pregrado. Universidad de Talca, Escuela de Ingeniería Industrial. Curicó, Chile.
- González A. (2004). Obtención de aceites esenciales y extractos etanólico de plantas del Amazonas. Universidad Nacional de Colombia.
- Gutiérrez, G. y Velásquez V. (2009). Determinación del efecto de la maduración de la lechosa (*Carica papaya* L.) sobre la concentración de papaína. Tesis para obtener el Título Profesional de Ingeniero Químico. Universidad Rafael Urdaneta- Venezuela

- Hellebrekers, B., Trimbos, T., Trimbos, J., Emeis, J., y Kooistra, T. (2000). El uso de agentes fibrinolíticos en la prevención de la formación de adherencias postoperatorias. *Fertil*; 74 (2): 203-212.
- Idstein, H., Keller, T. y Schreier, P. (1985). Volatile constituents of mountain papaya (*Carica candamarcensis*, syn. *C. pubescens* Lenne et Koch) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1985, vol. 33, no 4, p. 663-666.
- Indranila, I. y Ulfah, M. (2015). Uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun karika (*Carica pubescens*) dengan metode DPPH beserta identifikasi senyawa alkaloid, fenol dan flavonoid. e-Publikasi Ilmiah Fakultas Farmasi Unwahas Semarang, 2015, p. 105-111.
- Kolac, C., Streichhan, P. y Lehr, C., (1996). Oral bioavailability of proteolytic enzymes. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, vol. 42, no4: 222-232.
- Krajewski, D., Duque, C. y Schrejer, P. (1997). Aliphatic β -d-glucosides from fruits of *Carica pubescens*. *Phytochemistry*, 1997, vol. 45, no 8, p. 1627-1631.
- Krishnaiah, D., Awang, B., Rosalam, S. y Buhri, A. (2002). Commercialisation of papain enzyme from papaya. Chemical Engineering Programme School of Engineering and Information. Technology University Malaysia Sabah. http://s3.amazonaws.com/zanran_storage/pkukmweb.ukm.my/ContentPages/18257369.pdf . [Leído: 8 de octubre de 2015, 18:50 GMT-3].
- Kyndt, T., Romeijn-Peeters, E., Van Droogenbroeck, B., Romero-Motochi, J., Gheysen, G. y Goetghebeur, P. (2005) Species relationships in the genus *Vasconcellea* (Caricaceae) based on molecular and morphological evidence. *American Journal of Botany* 92(6): 1033–1044.

- Laily, A. y Suranto, S. (2012). Characterization of *Carica pubescens* in Dieng Plateau, Central Java based on morphological characters, antioxidant capacity, and protein banding pattern. *Jurnal Nusantara Bioscience*, 2012, vol. 4, no 1, p. 16-21.
- Leipner, J., Iten, F., y Saller. (2001). Terapia R. con enzimas proteolíticas en enfermedades reumáticas. *Biofármacos*, 15 (12): 779-789.
- Lizcano, A. y Vergara, J. (2008). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.
- López, D. (2010). El uso de la inulina y chamburo (*Carica pubescens*) en la tecnología de elaboración de yogurt con trozos de frutas tipo 11 en la quesera el "Salinerito". Tesis para obtener el Título Profesional de Ingeniero de Alimentos. Universidad Técnica de Abanto- Ecuador
- Lorkowski, G. (2012). Gastrointestinal absorption and biological activities of serine and cysteine proteases of animal and plant origin: review on absorption of serine and cysteine proteases. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, 4(1): 10-27.
- Mamani, R. y Quiroz, J. (2017). "Investigación para la cuantificación de ácido ascórbico en la elaboración de una bebida de noni (*Morinda citrifolia*) con maracuyá (*Passiflora edulis*)". Tesis de pregrado. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. Arequipa. Perú. Disponible en <http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/2415/IAmapurz.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Visitada el 4/01/18.

- Mansur, F., Luoga, W., Buttle, D., Duce, I., Lowe, A. y Behnke, J. (2014). The anthelmintic efficacy of natural plant cysteine proteinases against two rodent cestodes *Hymenolepis diminuta* and *Hymenolepis microstoma* in vitro. *Veterinary Parasitology* [2014, 201(1-2): 48-58].
- Morales, A. y Duque (1987). Aroma constituents of the fruit of the mountain papaya (*Carica pubescens*) from Colombia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35(4): 538 – 540. Disponible en <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/8847/1/Componentes%20volatiles%20de%20los%20frutos%20de%20Vasconcellea%20pubescens.pdf>. Visitada el 23 de febrero de 2019.
- Mu'awwanah, A y Ulfah, M. (2015). Uji aktivitas antioksidan fraksi n-heksan ekstrak etanol daun karika (*Carica pubescens*) dan identifikasi senyawa alkaloid dan flavonoidnya. e-Publikasi Ilmiah Fakultas Farmasi Unwahas Semarang, 2015, p. 118-124.
- Mundo, J. y Serrano, D., (2012). Extracción de la enzima papaína del látex de *Carica papaya* (papayo) cultivado en el país y su aplicación en cicatrices tipo queloides y verrugas. Tesis de pregrado. Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia. San Salvador, El Salvador.
- Noriega, P., Calero D., Larenas, C., Maldonado, M. y Vita, P., (2014). Componentes volátiles de los frutos de *Vasconcellea pubescens* A. DC. y *Passiflora tripartita* var. *mollissima* (KUNTH) usando la metodología HS-SPME-GC/MS. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida* 19(1): 5-11. Universidad Politécnica Salesiana, Ecuador.

- Obregón, W. (2008). Hidrolasas de látex de especies del género araujia. purificación y caracterización de las enzimas proteolíticas. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. La Plata. Argentina.
- Parodi, A., Haddix, S., Taghipour, N., Scaria, S., Taraballi, F., Cevenini, A., ... y Tasciotti, E. (2014). Bromelain surface modification increases the diffusion of silica nanoparticles in the tumor extracellular matrix. *ACS Nano*. 8(10): 9874-83. doi: 10.1021/nn502807n. Epub 2014 Sep 17.
- Pérez-Jiménez y Jara. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 2008, vol. 41, no 3, p. 274-285.
- Pfizer (2016). Papenzima ®. Prospecto farmacológico de especialidad medicinal. <http://www.farmaciasahumada.cl/fasaonline/fasa/MFT/PRODUCTO/P3878.HTM> [Leído: 16 de diciembre de 2015, 16:27 GMT-3].
- Pieper, B. y Caliri, M. (2003). Cuidado de las heridas no tradicional: Una revisión de la evidencia para el uso de los ácidos de azúcar, papaya / papaína y grasos. *J.Wound.Ostomy. Continence. Nurs.*; 30 (4): 175-183.
- Quino, J., Bernal, N. y Yácono, J. (2008). Diseño de un proceso experimental para la producción de papaína liofilizada. *Ingeniería Industrial* N° 26, 2008, ISSN 1025-9929, pp. 201-229
- Rangel, O., Pastor, B., Aguilera, C. y Gil, A., (2015) A Systematic Review of the Efficacy of Bioactive Compounds in Cardiovascular Disease: Phenolic Compounds, *Nutrients*, 7(7): 5177-5216.

- Rawlings, N., Morton, F., Kok, C., Kong, J. y Barrett, A. (2008) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 36, D320-D325. <http://web.archive.org/web/20080703074800/http://merops.sanger.ac.uk/index.htm>. [Leído: 2 de febrero de 2016, 12:00 GMT-3].
- Repo, R. y Encina, C. (2008). Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 2008, vol. 74, no 2, p. 108-124.
- Roberts, S. y Turner, N. (1995). *Introduction to biocatalysis using enzymes and micro-organisms*. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.
- Salón, L. 2013. Efecto de los agentes edulcorantes, temperatura y tiempo en la deshidratación osmótica de papayita de monte (*Vasconcellea pubescens*) tesis para obtención de título de ingeniero agroindustrial., Facultad de ingeniería y Ciencias Agrarias de la UNTRM-A -Perú.
- Sigma-Aldrich (2015). Papain, Physical Properties and Kinetics. <http://www.sigmaaldrich.com/life%ADscience/metabolomics/enzyme%ADexplorer/analytical%ADenzymes/papain.printerview.html>. [Leído: 15 de octubre de 2015, 18:20 GMT-3].
- Simirgiotis, M., Caligari, P. y Schmeda-Hirschmann, G. (2009). Identification of phenolic compounds from the fruits of the mountain papaya *Vasconcellea pubescens* A. DC. grown in Chile by liquid chromatography–UV detection–mass spectrometry. *Food Chemistry* 115 (2009): 775–784.
- Tébar. (2009). *Bioquímica Estructural Tema 2 - Proteínas: Definición, concepto y significación biológica. Aminoácidos: Sus clases y propiedades generales*. 84

y 85. pp: 107. Disponible en: <http://www.editorialtebar.com/flash/pdf/Bioquimica%20estructural.pdf>

Walraevens, V., Jaziri, M., Van, J., Schnek, A.G., Kleinschmidt, T. y Looze, Y. (1993). Isolation and preliminary characterization of the cysteine-proteinases from the latex of *Carica candamarcensis* Hook. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 374: 501-506.

Wong, D. (1995). *Food Enzymes: Structure and Mechanism*. Chapman & Hall, USA, 139-142.

VII. ANEXOS

ANEXO 1

Métodos de análisis físicoquímico

1. Determinación De Humedad (Método de la estufa de aire (A.O.A.C. 1990))

Fundamento

El método se basa en la determinación gravimétrica de la pérdida de masa, de la muestra desecada hasta masa constante en estufa de aire.

Material y Equipo

- ✓ Balanza analítica, sensibilidad 0,1 mg
- ✓ Cápsulas de vidrio, porcelana o metálica, con tapa
- ✓ Desecador con deshidratante adecuado
- ✓ Estufa regulada a 103 ± 2 °C
- ✓ Material usual de laboratorio

Procedimiento

- ✓ Efectuar el análisis en duplicado
- ✓ Colocar la cápsula destapada y la tapa durante al menos 1 hora en la estufa a la temperatura de secado del producto.
- ✓ Empleando pinzas, trasladar la cápsula tapada al desecador y dejar enfriar durante 30 a 45 min. Pesar la cápsula con tapa con una aproximación de 0,1mg. Registrar (m1). Pesar 5 g de muestra previamente homogeneizada. Registrar (m2).
- ✓ Colocar la muestra con cápsula destapada y la tapa en la estufa a la temperatura y tiempo recomendado 105 °C x 5 horas.

- ✓ Tapar la cápsula con la muestra, sacarla de la estufa, enfriar en desecador durante 30 a 45 min.
- ✓ Repetir el procedimiento de secado por una hora adicional, hasta que las variaciones entre dos pesadas sucesivas no excedan de 5 mg (m3).

Cálculo y expresión de resultados

La humedad del producto expresada en porcentaje, es igual a:

$$\%Humedad = \frac{m2 - m3}{m2 - m1} \times 100$$

Dónde:

- m1: masa de la cápsula vacía y de su tapa, en gramos
- m2: masa de la cápsula tapada con la muestra antes del secado, en gramos
- m3: masa de la cápsula con tapa más la muestra desecada, en gramos

Promediar los valores obtenidos y expresar el resultado con dos decimales.

Repetibilidad: La diferencia de los resultados no debe ser superior al 5% del Promedio.

2. Determinación de Proteínas (Método de Kjeldahl – equipo automático A.O.A.C. 1984)

Fundamento

El método se basa en la destrucción de la materia orgánica con ácido sulfúrico concentrado, formándose sulfato de amonio que en exceso de hidróxido de sodio libera amoníaco, el que se destila recibiendo en ácido bórico. El borato de amonio formado se valora con ácido sulfúrico.

Material y Equipo

- ✓ Balanza analítica, sensibilidad 0,1 mg.
- ✓ Equipo automático (digestor y destilador).
- ✓ Matraces Erlenmeyer de 500 ml.
- ✓ Material usual de laboratorio.

Reactivos

- ✓ Ácido sulfúrico concentrado, p.a.
- ✓ Agua oxigenada al 30 %.
- ✓ Catalizador Wieninger (tabletas o en polvo),
- ✓ Indicador mixto N° 5, para valoraciones de amoníaco
- ✓ Solución de ácido bórico al 3 % p/v.
- ✓ Solución de ácido sulfúrico 0,20 N.
- ✓ Solución de hidróxido de sodio al 32 % p/v

Procedimiento

- ✓ Realizar la muestra en duplicado.
- ✓ Pesar al 0,1 mg. alrededor de 700 a 750 mg de muestra homogeneizada (m), en papel filtro libre de nitrógeno, plegar el papel y colocar en tubo de digestión.
- ✓ Agregar 1 tableta o 5 g del catalizador, 3 mL de H₂O₂ al 30 % y 20 ml de H₂SO₄ conc. Poner a digerir en nivel 4 del regulador de temperatura durante media hora, luego elevar temperatura a nivel 6 por media hora y finalmente a nivel 8 hasta que la muestra esté completamente cristalina, aproximadamente 2,5 horas en total.

- ✓ Enfriar hasta aproximadamente 40 °C, agregar 40 ml de agua destilada y agitar para mezclar bien, antes de destilar.
- ✓ Colocar al matraz donde se recibirá el destilado 30 ml de ácido bórico al 3 %, 5 gotas del indicador mixto N° 5 y 150 ml de agua destilada. La salida del destilador debe quedar sumergida en la solución.
- ✓ Adaptar el tubo que contiene la muestra herméticamente y agregar el hidróxido de sodio al 32 % hasta que no se observe reacción (aproximadamente 60 ml).
- ✓ Destilar hasta obtener un volumen final de 400 ml.
- ✓ Titular el destilado con ácido sulfúrico 0,20 N hasta viraje del indicador (verde a rosado pálido).

Cálculo y Expresión de Resultados

$$\% \text{ Proteína} = \frac{1.4 \times N \times V \times \text{Factor}}{m}$$

Dónde:

N: normalidad del ácido sulfúrico

V: Volumen gastado de ácido sulfúrico en la titulación

M: masa de la muestra

Factor: 6,25: para carne, pescado, huevo, leguminosas y proteínas en general.

- 5,7: para cereales y derivados de soya.
- 6,38: leche
- 5,55: gelatina
- 5,95: arroz

Promediar los valores obtenidos y expresar el resultado con dos decimales.

Repetibilidad. La diferencia entre 2 resultado no debe ser superior a un 2% del promedio.

3. Determinación de Grasa (Metodo Gravimetrico NTP 209.263)

Principio del Método

El método está basado en la extracción de la grasa en la muestra, con éter de petróleo previamente hidrolizado con ácido clorhídrico.

Reactivos

- ✓ Éter de petróleo p.a intervalo de ebullición de 40 °C-60°C
- ✓ Solución de ácido clorhídrico 8N
- ✓ Agua Destilada
- ✓ Equipos y Materiales
- ✓ Balanza Analítica, con resolución de 0,1mg
- ✓ Estufa con regulador de temperatura a 100°C+-2°C
- ✓ Planchas de calentamiento
- ✓ Equipo de extracción tipo soxhlet con balón de capacidad de 250 ml
- ✓ Vasos de precipitación de 300 ml o 500 ml
- ✓ Probeta graduada de 100 ml
- ✓ Lunas de Reloj
- ✓ Embudos de vidrio
- ✓ Dedales para extracción
- ✓ Papel filtro de porosidad media
- ✓ Desecador de vidrio con agente desecante

Preparación de la muestra

Homogenizar la muestra en forma natural, en una bolsa de plástico, cuya capacidad sea doble de la muestra a analizar, aproximadamente 1min.

Procedimiento

- ✓ Pesar 4g- 5g de muestra en un vaso de precipitación de 300 ml - 500 ml
- ✓ Agregar lentamente mientras se agita, 45 ml de agua hirviendo para lograr una buena homogenización o Adicionar 55 ml de ácido clorhídrico 8N y agitar
- ✓ Cubrir con una luna de reloj y llevar lentamente a ebullición por 15min.
- ✓ Enjuagar la luna de reloj con agua destilada (aproximadamente 100 ml)
- ✓ Filtrar a través de papel filtro de porosidad media, enjuagando el vaso de precipitación tres veces con agua destilada.
- ✓ Continuar lavando el filtro hasta que el agua de lavada no de reacción acida.
- ✓ Transferir el papel húmedo y la muestra a un dedal de extracción y secar en un vaso pequeño a 100°C por un tiempo de 2 horas.
- ✓ Secar el balón de 250 ml por 1ha 100°C, enfriar en desecador hasta temperatura ambiente y pesar.
- ✓ Colocar el dedal de extracción que contiene la muestra en el Soxhlet y añadir éter de petróleo (120 ml a 150 ml según la capacidad del Soxhlet)
- ✓ Reflujar la muestra 4h, ajustando el calor de modo que el extractor sifonee mas de 30 veces.
- ✓ Secar el balón con la grasa extraída a 100°C hasta peso constante.
- ✓ Enfriar en desecador hasta temperatura ambiente y pesar.

Expresión de resultados

$$\%Grasa = \frac{P2 - P1}{m} \times 100$$

Donde:

P2: Peso de balón con grasa, g

P1: Peso de balón vacío, g

M: Peso de Muestra, g

4. DETERMINACIÓN DE CENIZAS (Método Gravimétrico NTP 209.265)

Principio del Método

El método se basa en la calcinación de la muestra a 550°C-600°C.

Equipos y Materiales

- ✓ Crisoles de porcelana
- ✓ Balanza analítica con resolución de 0,1mg
- ✓ Cocinilla, mechero
- ✓ Horna mufla para ser usado de 550°C a 600°C
- ✓ Estufa
- ✓ Desecador con agente desecante.

Preparación de la muestra

Homogenizar la muestra en forma natural, en una bolsa de plástico, cuya capacidad sea el doble de la muestra a analizar, aproximadamente 1min.

Procedimiento

- ✓ Pesar 2gr de muestra en el crisol de porcelano previamente pesado
- ✓ Quemar muestra hasta la desaparición de humos

- ✓ Colocar el crisol con la muestra en el horno mufla precalentado de 550°C a 600°C.
- ✓ Mantener el crisol en el horno hasta obtener cenizas libres de carbon.
- ✓ Colocar el crisol en una estufa por media hora.
- ✓ Transferir el crisol a un desecador, enfriar no menos de media hora y pesar.

Expresión de Resultados

$$\begin{aligned} & \% \text{ Cenizas} \\ & = \frac{\text{Peso de crisol con residuo (g)} - \text{Peso crisol vacío (g)}}{\text{Peso de Muestra (g)}} \times 100 \end{aligned}$$

Reportar el porcentaje de cenizas al primer decimal.

5. Determinación de la Fibra (Método NTP 205.003)

Principio del método

El residuo proveniente de la extracción de grasas de una muestra se somete a un doble hidrolisis ácida y alcalina. El filtrado se seca en una estufa y se pesa. Se lleva a ignición en una mufla hasta destrucción de la materia orgánica y se vuelve a pesar. La diferencia entre ambas pesadas da el contenido de fibra cruda que se expresa en 100gr de muestra seca.

Aparatos

- ✓ Estufa con termostato y aproximación de $\pm 2^\circ\text{C}$.
- ✓ Mufla eléctrica: Con termostato, que permita mantener durante el ensayo una temperatura de 600°C a 650°C.
- ✓ Balanza Analítica: Con presión de 0,0001g.

Reactivos

- ✓ Solución de ácido sulfúrico al 1,25%
- ✓ Solución de hidróxido de sodio al 1,25% libre de carbonatos
- ✓ Alcohol etílico al 95%
- ✓ Éter etílico o éter de petróleo.

Materiales

- ✓ Crisoles o Gooch Preparados con amianto o de porosidad media.
- ✓ Frasco lavador
- ✓ 02 vasos de 600cm³
- ✓ Papel filtro Whatman N°1 equivalente
- ✓ Embudo Buchner
- ✓ Papel filtro tarado. Whatman N°42 o equivalente

Preparación de la Muestra

Se muele la muestra, de manera que el 99% de las partículas pasen por el tamiz ITINTEC 0,841 mm (N°20).

Procedimiento

- ✓ Se determina exactamente una masa de 2g a 5g de la muestra con aproximación de 0,0001g.
- ✓ Se extrae la grasa de la muestra con éter de petróleo o éter etílico hasta que el solvente quede incoloro.
- ✓ Se seca la muestra hasta evaporar el solvente y se transfiere al vaso de 600cm³. Se añade 200cm³ de la solución de ácido sulfúrico caliente y se hierve durante 30 min contados desde el momento en que empieza la ebullición manteniéndose el volumen inicial.

- ✓ Se filtra en caliente, utilizando el papel de filtro Whatman N°1 y se lava el residuo con agua caliente destilada, hasta neutralidad del líquido del lavado.
- ✓ Se filtra en el crisol o sobre el papel de filtro Papel filtro tarado, Whatman N°42. Con ayuda de un chorro fino de agua destilada se pasa todo el residuo del vaso al filtrado. Se sigue lavando el vaso y el filtro hasta que el líquido cristalino no de reacción alcalina. Luego se lava con por lo menos 2 porciones de 100cm³ de alcohol etílico al 95%.
- ✓ Se seca en estufa a 130°C. se deja enfriar en un desecador y se determina la masa. Se repite este proceso hasta obtener masa constante. Descontada la tara, la cifra obtenida representa la masa de fibra bruta.
- ✓ Se calcina hasta cenizas blancas, se enfría en desecador y se determina la masa. Descontada la tara, la cifra obtenida representa la masa de las cenizas de la fibra.

Expresión de resultados

La diferencia entre las determinaciones de masa representa la fibra cruda llamada también fibra pura.

El contenido de fibra cruda se halla mediante la siguiente formula:

$$Fc = \frac{Fb - C}{M} \times 100$$

Donde:

Fc: Por ciento de fibra cruda.

Fb: Masa de fibra bruta, en gramos.

C: Masa de cenizas de la fibra, gramos.

M: Masa de la muestra, en gramos

El contenido de fibra cruda sobre base seca, se halla mediante la siguiente formula:

$$FC (masa seca) = \frac{Fc \times 100}{(100 - H)}$$

Donde:

Fc: Por ciento de fibra cruda.

Fb: Masa de fibra bruta, en gramos

C: Masa de cenizas de la fibra, en gramos

M: Masa de la muestra, en gramos

El contenido de fibra cruda sobre base seca, se halla mediante la siguiente formula:

$$Fc (masa seca) = \frac{Fc \times 100}{(100 - H)}$$

Donde:

Fc: Por ciento de fibra cruda

H: Humedad de la muestra

6. DETERMINACIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO

La determinación de hidratos de carbono se realiza por diferencia según las recomendaciones de la FAO y la OMS (1982), a partir de los resultados obtenidos en las determinaciones de grasa (G), cenizas (C), proteína (P), humedad (H) y fibra dietética (FD) de forma que:

$$HIDRATOS DE CARBONO (\%) = 100 - (G + C + PB + H + FD)$$

7. DETERMINACION DE CONTENIDO CALORICO (KCAL%)

Según la FAO (1982) y la Universidad Complutense de Madrid (2012), el cálculo de calorías, valor energético o calórico se halla en términos de kilocalorías la oxidación de los alimentos en el organismo tiene como valor medio el siguiente rendimiento:

1 g de grasa = 9 kcal, 1 g de proteína = 4 kcal, 1 g de hidratos de carbono = 4 kcal, 1 g de fibra \approx 2 kcal

ANEXO 2

Tomas fotográficas del proceso de extracción de papaína a partir de gualacongo



Figura 7 Recepcion de la materia prima, elaboración propia (2019)



Figura 8 Acondicionamiento de la materia prima, elaboración propia (2019)



Figura 9 Fraccionamiento de la materia prima, elaboración propia (2019)



Figura 10 Trituración de la materia prima, elaboración propia (2019)



Figura 11 Adición del solvente, elaboración propia (2019)



Figura 12 Centrifugación, elaboración propia (2019)



Figura 13 Secado en la estufa, elaboración propia (2019)

ANEXO 3

Análisis estadístico

Descriptivos

Porcentaje de proteína

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo	Varianza entre-componente
					Límite inferior	Límite superior			
76°	10	5,19	,085	,027	5,13	5,25	5	5	
86°	10	5,46	,127	,040	5,37	5,55	5	6	
96°	10	6,29	,079	,025	6,23	6,35	6	6	
Total	30	5,65	,486	,089	5,47	5,83	5	6	
Modelo			,099	,018	5,61	5,68			
Efectos fijos									
Efectos aleatorios				,331	4,22	7,07			,328

Prueba de homogeneidad de varianzas

Porcentaje de proteína

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
1,489	2	27	,244

ANOVA

Porcentaje de proteína

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	6,573	2	3,286	334,329	,000
Dentro de grupos	,265	27	,010		
Total	6,838	29			

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Porcentaje de proteína

HSD Tukey

(I) Concentración de etanol	(J) Concentración de etanol	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
76°	86°	-,270 [*]	,044	,000	-,38	-,16
	96°	-1,100 [*]	,044	,000	-1,21	-,99
86°	76°	,270 [*]	,044	,000	,16	,38
	96°	-,830 [*]	,044	,000	-,94	-,72
96°	76°	1,100 [*]	,044	,000	,99	1,21
	86°	,830 [*]	,044	,000	,72	,94

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Porcentaje de proteína

HSD Tukey^a

Concentración de etanol	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
76°	10	5,19		
86°	10		5,46	
96°	10			6,29
Sig.		1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 10,000.