

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**Contenido de bromelina en la cáscara de  
*Ananas comosus* “piña” y su relación  
con la madurez del fruto**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGO EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

Presentado por el:  
Bach. HUAMANÍ NÚÑEZ, Luis

AYACUCHO – PERÚ  
2019



A Dios por darme la esperanza y a mis queridos padres por el gran esfuerzo y ánimos que me dieron para seguir adelante con la presente investigación.



## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, por acogerme en sus aulas, por todas las enseñanzas recibidas en mi formación profesional y direccionarme por los maravillosos senderos de la ciencia.

A los docentes del Área Académica de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por ser mis maestros.

Mis infinitos agradecimientos a los maestros, docentes y estudiantes de la Escuela Profesional de Biología, forjadores y constructores de la humanidad al servicio de la sociedad; quienes me brindaron orientaciones y consejos de manera permanente.

Mi sincero agradecimiento a la Blga. Sonia Haydeé Palomino Felices, asesora de la presente investigación, por brindarme sus conocimientos y orientaciones.



## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE ANEXOS	xi
RESUMEN	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
1.1. Antecedentes	3
1.2. <i>Ananas comosus</i> “piña”	9
1.3. Taxonomía de <i>Ananas comosus</i> “piña” Merr., 1917	9
1.4. Composición química de <i>Ananas comosus</i> “piña”	9
1.5. Bromelina de <i>Ananas comosus</i> “piña”	10
1.6. Método de extracción de bromelina	11
1.7. Método de medición de concentración de proteína	12
III. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1. Ubicación	15
3.2. Población	15
3.3. Muestra	15
3.4. Metodología	15
3.4.1. Desinfección con etanol al 70%	15
3.4.2. Preparación del extracto crudo	16
3.4.3. Extracción de bromelina mediante precipitación con etanol	16
3.4.4. Curva patrón o curva de calibración	17
3.4.5. Medición del contenido de proteínas	17
3.4.6. Determinación de la actividad enzimática	17
3.4.7. Procedimiento de prueba de catálisis	18
IV. RESULTADOS	21
V. DISCUSIÓN	31
VI. CONCLUSIONES	35
VII. RECOMENDACIONES	37
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
ANEXOS	45





## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Porcentaje de sacarosa en cáscara de <i>Ananas comosus</i> “piña” de variedad hawaiana del mercado “Nery García Zárate” procedente de Sivia–VRAEM, determinado por refractometría en el Laboratorio de Biotecnología-UNSCH. Ayacucho, 2019	23
Figura 2. Proteínas del extracto crudo de cáscara de <i>Ananas comosus</i> “piña” variedad hawaiana del mercado “Nery García Zárate” procedente de Sivia–VRAEM, determinadas por el método de biuret modificado por Robinson en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas UNSCH, 2019.	24
Figura 3. Proteína aislada y precipitada con etanol de cáscara de <i>Ananas comosus</i> “piña” variedad hawaiana procedentes de Sivia–VRAEM, determinadas por el método de biuret modificado por Robinson en el Laboratorio de Biotecnología-UNSCH, 2019	25
Figura 4. Actividad proteolítica de proteína aislada y precipitada con etanol de cáscara de <i>Ananas comosus</i> “piña” variedad hawaiana, procedente de Sivia–VRAEM comercializadas en el mercado Nery García Zárate, determinadas por proteólisis de albúmina de suero bovino (BSA) con el método de biuret modificado por Robinson en Laboratorio de Biotecnología de la UNSCH. Ayacucho, 2019.	26
Figura 5. Actividad específica de proteína aislada y precipitada con etanol de cáscara de <i>Ananas comosus</i> “piña” variedad hawaiana procedente de Sivia–VRAEM. Ayacucho, 2019	27
Figura 6. Modelo de Lineweaver – Burk, con la que, se calculó la Vmax y Km de la bromelina obtenida de la cáscara de <i>Ananas comosus</i> “piña”. Ayacucho, 2019	28
Figura 7. Actividad proteolítica de bromelina comercial y proteína aislada y precipitada con etanol de cáscara de <i>Ananas comosus</i> “piña” variedad hawaiana del VRAEM-Sivia. Laboratorio de Biotecnología de Facultad de Ciencias Biológicas-UNSCH, 2019	29



## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
Anexo 1. Extracción de bromelina de <i>Ananas comosus</i> “piña” de variedad hawaiana procedentes de Sivia-VRAEM-comercializadas en Mercado de la Asociación de Comerciantes “Nery García Zárate”, Huamanga-Ayacucho 2019	47
Anexo 2. Determinación de la actividad enzimática de bromelina de <i>Ananas comosus</i> “piña” de variedad hawaiana procedentes de Sivia-VRAEM-comercializada en el mercado Nery García Zárate. Huamanga, 2019	48
Anexo 3. Calibración de albúmina de suero bovino (BSA) usando el método de biuret modificado por Robinson con el espectrofotómetro a una longitud de onda de 554 nm. Ayacucho, 2019	49
Anexo 4. Gráfica de curva de calibración de albúmina de suero bovino usando el método de biuret modificado por Robinson. Huamanga-Ayacucho, 2019	50
Anexo 5. Proteínas del extracto crudo de cáscaras de <i>Ananas comosus</i> “piña” variedad hawaiana del mercado local Nery García Zárate procedente de Sivia-VRAEM. Ayacucho, 2019	51
Anexo 6. Concentración de proteína precipitada con etanol de cáscaras de <i>Ananas comosus</i> “piña” variedad hawaiana. UNSCH, 2019	52
Anexo 7. Actividad proteolítica de proteínas precipitadas con etanol de cáscara de <i>Ananas comosus</i> “piña”, determinada por proteólisis de albúmina de suero bovino (BSA). UNSCH-Ayacucho, 2019	53
Anexo 8. Actividad específica de bromelina de cáscaras de <i>Ananas comosus</i> “piña” de variedad hawaiana. Ayacucho, 2019	54
Anexo 9. Km y Vmax de bromelina precipitada con etanol de cáscaras de <i>Ananas comosus</i> “piña” de variedad hawaiana de Sivia-VRAEM-comercializada en mercado Nery García Zárate de Huamanga-Ayacucho, 2019	55

Anexo 10.	Prueba de normalidad de Anderson - Darling para porcentaje de sacarosa de <i>Ananas comosus</i> “piña” de variedad hawaiana procedente de Sivia-VRAEM, determinados mediante programa estadístico Minitab 17. Ayacucho, 2019.	56
Anexo 11.	Prueba de normalidad de Anderson - Darling de concentración proteica de extracto crudo de <i>Ananas comosus</i> “piña” variedad hawaiana procedente de Sivia-VRAEM-comercializada en el mercado Nery García Zárate. Huamanga-, 2019	57
Anexo 12.	Prueba de normalidad de Anderson – Darling de proteína precipitada con etanol de cáscara de <i>Ananas comosus</i> “piña” variedad hawaiana procedente de Sivia-VRAEM-comercializada en el mercado Nery García Zárate. Huamanga, 2019.	58
Anexo 13.	Prueba de normalidad de Anderson – Darling de actividad proteolítica de bromelina extraída de cáscara de <i>Ananas comosus</i> “piña” variedad hawaiana procedente de Sivia-VRAEM-comercializada en el mercado Nery García Zárate. Ayacucho, 2019	59
Anexo 14.	Comparación en pareja de Tukey con nivel de confianza 95 % de actividad proteolítica de bromelina extraída de cáscara de <i>Ananas comosus</i> “piña” variedad hawaiana, procedente de Sivia-VRAEM-comercializada en el mercado Nery García Zárate. Ayacucho, 2019	60
Anexo 15.	Separación manual de cáscara del fruto de <i>Ananas comosus</i> “piña” de variedad hawaiana. Ayacucho, 2019	61
Anexo 16.	Extracción de bromelina de cáscara de <i>Ananas comosus</i> “piña” de variedad hawaiana mediante precipitación con etanol. Ayacucho, 2019	62
Anexo 17.	Bromelina del tallo de <i>Ananas comosus</i> “piña” B4882 importado por Merck – Perú de Sigma Aldrich USA. Ayacucho, 2019	63
Anexo 18.	Matriz de consistencia	64

## RESUMEN

La piña es considerada como fuente principal de bromelina, una enzima de múltiples aplicaciones industriales como: ablandador de carne, suplemento alimenticio; siendo la cáscara del fruto un residuo abundante y barato que se genera después del consumo o de su aprovechamiento para elaborar néctar. La finalidad de la investigación fue determinar el contenido de bromelina en la cáscara de *Ananas comosus* "piña" y su relación con la madurez del fruto. Para obtener el extracto crudo de proteínas, la cáscara se separó manualmente de la pulpa, previa desinfección, se pesaron 140 g y se refrigeraron a -10 °C. Después de 24 h se añadieron 35 mL de tampón de extracción (tampón fosfato de sodio 0,02 M de pH 7,0 conteniendo EDTA 5 mM) a 4 °C por 5 min, luego se trituró, se filtró a través de una gasa y se centrifugó a 200 x g por 20 min, se guardó el sobrenadante a -10 °C para determinar los parámetros químicos y el contenido proteico del extracto crudo. La sacarosa se determinó mediante refractometría. Se usó el método de biuret modificado por Robinson para el análisis de proteínas del extracto crudo, precipitado con etanol y la actividad proteolítica de bromelina que hidrolizó albúmina de suero bovino (BSA). El porcentaje (%) de sacarosa en la cáscara de piña inmadura (IM) fue de  $8,64 \pm 2,1$ ; madura (M)  $14,22 \pm 1,7$  y posmadura (PM)  $10,86 \pm 1$ . La concentración de proteínas de extracto crudo y precipitado con etanol en cáscara de piña inmadura fue  $2,15 \pm 0,30$  y  $2,33 \pm 0,10$  mg/mL; madura  $2,61 \pm 0,32$  y  $3,14 \pm 0,40$  mg/mL; posmadura  $2,71 \pm 0,12$  y  $3,67 \pm 0,36$  mg/mL, respectivamente. La actividad proteolítica de bromelina precipitada de la cáscara de fruta posmadura  $2,86 \pm 0,43$  U/mL; madura  $5,17 \pm 0,72$  U/mL e inmadura  $6,51 \pm 0,92$  U/mL. La actividad específica fue para posmadura  $0,78 \pm 0,11$  U/mg; madura  $1,68 \pm 0,35$  U/mg; inmadura  $2,79 \pm 0,38$  U/mg. Se determinó  $V_{max}$ :  $0,0114$  (mg/mL)  $\text{min}^{-1}$ ;  $K_m$ :  $21,68$  mg/mL.

**Palabras clave:** piña, cáscara, bromelina, actividad proteolítica.



## I. INTRODUCCIÓN

La investigación trata sobre el contenido de bromelina en la cáscara de diferentes grados de madurez de *Ananas comosus* “piña” variedad hawaiana. La “piña” es un fruto tropical no climatérico.<sup>1</sup> El índice de color describe claramente el proceso de maduración de la piña.<sup>2</sup> Siendo la “piña” hasta la fecha considerada como la mejor fuente de bromelina.<sup>3</sup> Una enzima proteolítica que rompe uniones peptídicas en distintos puntos del interior de una proteína.<sup>4</sup> Clasificado según la base de datos MEROPS en clan CA, familia C1, sub familia C1A y peptidasa C01.028 para bromelina del fruto.<sup>5</sup> La bromelina en la actualidad es ampliamente utilizada en alimentos, cosméticos, productos farmacéuticos y recientemente en tratamientos contra el cáncer.<sup>6, 7</sup> La fuente de bromelina es el tallo de la “piña” (80%), fruto de la “piña” (10%) y se ha encontrado en concentraciones menores en: cáscara, núcleo, hojas y corona.<sup>3, 8</sup> La cáscara de *Ananas comosus* “piña” es una fuente potencial para la extracción de bromelina, debido a la gran cantidad de residuos después del consumo y/o procesamiento.<sup>9</sup> La cáscara de “piña” está dispuesta generalmente o se utiliza como compost.<sup>10</sup> En el departamento de Ayacucho se utiliza de manera empírica como saborizante en preparados de alimentos y bebidas (dietas diarias), sin embargo, tanto en los mercados de Huamanga como en los mercados de los distritos aledaños se desechan las cáscaras. Razón por la cual se realizó el presente estudio para iniciar una línea de investigación usando los desechos de las cáscaras de *Ananas comosus* “piña” y dar valor agregado al producto.

Las técnicas de extracción y purificación de bromelina se conocen y son utilizadas con frecuencia en la actualidad. El uso de solventes orgánicos permite el desarrollo de un proceso respetuoso con el medio ambiente y muy rentable al extraer y purificar la bromelina a partir de residuos de la “piña”.<sup>3</sup> El etanol disminuye la solubilidad del zumo de tejido vegetal, produciendo agregados de moléculas proteicas que tienden a precipitar.<sup>11</sup> La extracción de bromelina se

realizó mediante trituración de la cáscara de “piña”, en mezclador de alta velocidad. Luego se precipitó con etanol absoluto. Alterando las condiciones del solvente y aprovechando los cambios en la solubilidad de la proteína, en relación con muchas otras proteínas y macromoléculas en un extracto celular.<sup>12</sup> Para prevenir la activación de la capacidad proteolítica de bromelina durante la extracción se utilizó 1) buffer con EDTA, 2) bajas temperaturas, 3) precipitante adecuado % (v/v). El proceso a bajas temperaturas y pH adecuado disminuyó la desnaturalización de la enzima y la actividad de la proteasa.<sup>13</sup> La cuantificación de proteína se llevó a cabo según el método de biuret modificado por Robinson, determinado espectrofotométricamente a 554 nm.<sup>13</sup> Se usó albúmina de suero bovino (BSA) para medir la actividad proteolítica de bromelina.<sup>14</sup>

Los objetivos que se trazaron en la investigación fueron:

#### **Objetivo general**

Determinar el contenido de bromelina en la cáscara de *Ananas comosus* “piña” y su relación con la madurez del fruto.

#### **Objetivos específicos**

- Caracterizar la “piña” de acuerdo al grado de madurez mediante análisis físico-químico.
- Medir la concentración de proteína en mg/mL del extracto crudo y aislado, precipitado con etanol mediante espectrometría visible.
- Evaluar la actividad proteolítica de bromelina aislada y precipitado con etanol por digestión de albúmina de suero bovino en U/mL
- Calcular la actividad específica en U/mg.
- Determinar  $k_m$  y la  $V_{max}$ .



## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes

En el departamento de Ayacucho los residuos de consumo de la fruta de *Ananas comosus* “piña”, principalmente la cáscara se utiliza de manera empírica solamente como saborizante en bebidas; sin embargo, tanto en los mercados de Huamanga como en los mercados de los distritos aledaños se desechan los residuos de la fruta, siendo la cáscara de “piña” una fuente potencial para la extracción de bromelina, debido a la gran cantidad de residuos después del consumo y/o procesamiento; cabe resaltar la falta de conocimiento e investigación sobre el contenido de bromelina en la cáscara de *Ananas comosus* “piña” para dar valor agregado y uso adecuado en la región.<sup>9</sup>

En las regiones y/o países productores de *Ananas comosus* “piña” hay avances promisorios en la extracción de bromelina de las diferentes partes de la “piña” y aplicación de procedimientos y técnicas diversas para tal fin.

La investigación realizada en la Universidad de Paraíba Brasil, donde evaluaron parámetros químicos y la actividad de cáscara de *Ananas comosus* “piña” de las variedades perolera, cayena lisa y cayena smooth y sus híbridos Emepa-01, Imperial y MD-2, reportaron a las variedades perolera y cayenne smooth con niveles de azúcares totales significativamente más altos ( $p < 0,05$ ) que los híbridos. La concentración de proteína del extracto crudo de cultivar Imperial de la cáscara obtuvo 10,4 mg/mL con actividad proteolítica usando como sustrato caseína a 37 °C tuvo 68,56 U/mL. La actividad específica de la cáscara de “piña” variedad perolera con 10,01 U/mg proporcionó un valor más significativamente alto ( $p < 0,05$ ) que los observados en las otras muestras.<sup>15</sup>

La extracción de bromelina a partir de cáscara de “piña” de variedades Nang Lae (NL) y Phu Lae (PL) en Tailandia, utilizando como agentes de extracción agua destilada (DI); agua destilada más cisteína y ácido etilendiaminotetraacético EDTA (DI-CE); tampón de fosfato de sodio pH 7,0 (PB) y PB que contiene

cisteína y EDTA (PB-CE)., la cáscara se licuó por separado, el zumo obtenido se centrifugó a  $10\ 000 \times g$  por 20 min a  $4\ ^\circ\text{C}$  y el sobrenadante (extracto crudo) se usó en el experimento. La concentración de proteína se determinó usando el método de Bradford y la actividad proteolítica utilizando caseína como sustrato a  $37\ ^\circ\text{C}$  y pH 7,0. Obtuvieron resultados de  $0,564 \pm 0,02$  mg/mL (PB-CE) y  $0,702 \pm 0,01$  mg/mL (PB) de proteínas del extracto crudo de la variedad NL;  $0,625 \pm 0,02$  mg/mL (PB-CE) y  $0,574 \pm 0,02$  mg/mL (PB) de proteínas de la variedad PL. La actividad proteolítica de bromelina fue  $5,74 \pm 0,06$  U/mL (PB-CE) y  $2,76 \pm 0,04$  U/mL (PB) de variedad NL;  $6,98 \pm 0,11$  U/mL (PB-CE) y  $5,97 \pm 0,19$  U/mL (PB) de la variedad PL.<sup>16</sup>

Investigación realizada sobre la precipitación de bromelina con etanol, polietilenglicol y sulfato de amonio; con el objetivo de recuperar los residuos agrícolas de *Ananas comosus* “piña” (tallo y hojas) y residuos de frutas (tallo y cáscara), en la Universidad de Campinas. El extracto crudo se centrifugó a  $2\ 000\ g$  por 20 min a  $4\ ^\circ\text{C}$  para eliminar partículas insolubles. Luego precipitaron con etanol gota a gota del 30 al 70% (v/v), centrifugaron a  $2\ 000\ g$  por 20 min a  $4\ ^\circ\text{C}$ . La concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford y la actividad enzimática de bromelina sobre sustrato azocaseína a  $37\ ^\circ\text{C}$ . Reportaron concentración de proteínas en extracto crudo  $0,201$  mg/mL y de bromelina precipitado  $0,084$  mg/mL; así mismo actividad enzimática de bromelina precipitada  $15,96$  U/mL y estimaron actividad específica  $189,5$  U/mg.<sup>17</sup>

En la obtención de bromelina de los desechos industriales en Trujillo-Perú, a partir de las variedades roja y blanca de *Ananas comosus* “piña” en 10, 11, 12 meses de edad; los parámetros óptimos para precipitación fueron,  $3$  a  $5\ ^\circ\text{C}$ ,  $10$  a  $35$  min. Para la digestión pH  $6$ , temperatura  $37\ ^\circ\text{C}$ , tiempo  $60$  min, porcentaje de saturación de sulfato de amonio  $40$  a  $45$ ; reportaron mayor concentración de bromelina en “piña” de 11 meses, variedad roja  $1,10$  mg/mL y blanca  $0,98$  mg/mL. Evaluaron la actividad específica de  $0,41$  UE/mg de proteína en variedad blanca respecto a “piña” roja con  $0,37$  UE/mg de proteína ambos de 12 meses; la actividad proteolítica es mayor en variedad blanca con respecto a la roja  $0,34$  UE/mL y  $0,28$  UE/mL respectivamente.<sup>18</sup>

En la investigación sobre el contenido de compuestos bioactivos y su contribución a la capacidad antioxidante durante la maduración de “piña” cultivar esmeralda en México. Se midió (%) de sacarosa, en los diferentes estados de maduración: para M1 =  $14,86$ ; M2 =  $16,53$ ; M3 =  $16,40$ ; M4 =  $16,12$

respectivamente, sólo fue significativamente diferente para estado de madurez (M1) respecto a los demás estados de maduración con un nivel de confianza de 95 %.<sup>19</sup>

En el estudio experimental de extracción de bromelina de “piña” variedad perolera, cultivados *in vitro* bajo diferentes condiciones de micropropagación en Sao Paulo. La temperatura óptima de digestión enzimática sobre albúmina de suero bovino (BSA) fue a 37 °C; la mayor concentración de bromelina hallada fue de 18,379 mg/mL mediante el método de Bradford. La actividad proteolítica fue 0,00248 U/mL determinado con el método de biuret a 540 nm usando albúmina de suero bovino como sustrato, a una temperatura de 36 °C con pH 5,7 por 60 min y se calculó la actividad específica 0,0001650 U/mg.<sup>20</sup>

Se evaluó la actividad enzimática de bromelina presente en el eje de inflorescencia del fruto deshidratado de *Ananas comosus* “piña” en Guatemala, para determinar la incidencia de temperaturas de deshidratación en la actividad enzimática, entre temperaturas menores a la de desnaturalización proteica (55 °C); temperaturas de 30, 40 y 50 °C, se determinó la actividad enzimática por el método de coagulación de leche MCU, con actividad de 3,500 MCU a 40 °C y 2 % de preservante.<sup>21</sup>

La extracción y cinética de bromelina obtenida de *Ananas comosus* “piña”, variedad perolera, en Colombia; en la que el extracto crudo de la pulpa de la fruta se llevó a refrigeración agregando benzoato de sodio como preservante, se precipitó con etanol al 50 % (v/v) en agua. El extracto se centrifugó a 4 000 rpm por 20 min. La mezcla total se dejó en reposo durante 50 h manteniendo la temperatura entre 5 y 10 °C y se centrifugó a 4 000 rpm por 25 min, se obtuvo un precipitado amarillo oscuro que se dejó secar a temperatura ambiente. La cuantificación de proteína mediante el método de Biuret fue 1,46 mg/mL. La actividad enzimática se determinó usando caseína como sustrato. El comportamiento cinético de la bromelina se ajusta al modelo de Michaelis Menten, determinaron la  $V_{max}$   $9,83e^{-4}$  M/seg y  $K_m$  de  $7,962e^{-4}$  M.<sup>22</sup>

La purificación de bromelina a partir de residuos de “piña” variedad perolera mediante un proceso de precipitación con etanol, con el objetivo de purificar bromelina de los desechos industriales. El tallo y la cáscara fueron triturados para obtener 500 mL de jugo que fue filtrado y centrifugado a 15 000 x g por 15 min a 4 °C, finalmente el sobrenadante (extracto crudo) se guardó a -18 °C. El extracto crudo se precipitó con etanol absoluto añadiendo gota a gota en

fracciones de 20 a 90% (v/v) a 0 °C. Luego fue centrifugado a 2 000 x g por 20 min a 4 °C y se resolubilizó en tampón fosfato (0,03 M, pH 7,0). El contenido proteico se determinó con el método de Bradford 0,23 ± 0,01 mg/mL en el extracto crudo y 0,10 ± 0,02 mg/mL de bromelina precipitado. La actividad proteolítica se determinó usando como sustrato caseína a 37 °C, se obtuvo 2,82 ± 0,04 U/mL y se estimó actividad específica 28,20 ± 0,15 U/mg para bromelina precipitada.<sup>23</sup>

La extracción de bromelina a partir de pulpa de *Ananas comosus* “piña” de variedad perolera de dos grados de madurez 12 y 18 meses de edad, con la finalidad de proponer el mejor estado de maduración para la extracción de enzima a nivel comercial en Ecuador. En “piñas” de 12 meses, los °Brix fueron 8,64 ± 0,26 y 10,03 ± 0,23 en “piñas” de 18 meses. El sobrenadante del extracto crudo se obtuvo centrifugando a 8 000 rpm por 30 min a 4 °C; mientras la purificación de la enzima se realizó por un sistema bifásico acuoso (SBA) obteniendo un 130,21 % de recuperación de la actividad enzimática. La concentración proteica del extracto crudo y purificado se determinó mediante el método de Bradford, para fruta de 12 meses reportaron 0,23 mg/mL en extracto crudo y 0,14 mg/mL en purificado; para “piña” de 18 meses 0,32 mg/mL en extracto crudo y 0,2 mg/mL en purificado. La actividad enzimática fue 184,62 TU/mg para “piña” de 12 meses y 65 TU/mg para “piña” de 18 meses.<sup>24</sup>

La cáscara de *Ananas comosus* “piña” variedad Pearl en Brasil se usó como fuente principal de bromelina. Para la extracción de bromelina la cáscara se molió usando un exprimidor doméstico sin agua ni tampón. Luego el zumo se centrifugó a 8 000 x g a 4 °C durante 30 min. El sobrenadante se enfrió a 4 °C y las proteínas se precipitaron usando sulfato de amonio en el rango de 40 80% de saturación. La sal se añadió lentamente al extracto bajo agitación constante y, después de la adición completa de sal, permaneció bajo agitación durante 30 min a 4 °C. La suspensión resultante se centrifugó a 8 000 x g a 4 °C durante 15 min. El sobrenadante se desechó y el precipitado se disolvió en un tampón de fosfato de potasio a pH 7,0. El contenido total de proteínas se analizó utilizando BSA como proteína de referencia mediante el método de Bradford a 595 nm. Resultado obtenido fue 0,25 mg/mL y 0,31 mg/mL de proteína, con una actividad proteolítica de 0,13 U/mL y 0,35 U/mL; actividad específica de 0,52 U/mg y 1,13 U/mg en el extracto crudo y precipitado respectivamente.<sup>25</sup>

En la extracción y purificación de bromelina de *Ananas comosus* “piña” mediante precipitación fraccionada con etanol, en la Universidad Federal de Ubelandia; la cáscara, el tallo y las hojas se procesaron en un extractor de cocina y luego se centrifugaron a 10 000 x g durante 20 min a 4 °C. Luego añadieron gota a gota etanol al 98 % (v/v) a 0 °C en fracciones de 30 y 70 % (v/v). La solución se centrifugó a 10 000 x g durante 20 min a 4 °C y el sedimento resultante se suspendió en tampón fosfato 20 mM, pH 7,0. Después de la purificación, el pH óptimo de la bromelina cambió de 7,0 a 8,0 y mantuvo la actividad incluso después de los 60 °C, sin embargo, su óptimo fue de 50 °C. Estos resultados mostraron que la recuperación de bromelina con precipitación fraccionada con etanol es un proceso viable, en el que se obtiene una enzima de buena calidad para aplicaciones industriales.<sup>26</sup>

En la investigación realizada sobre extracción y purificación de bromelina de tallo y pulpa de *Ananas comosus* “piña” madura en Nigeria, procedieron a licuar, luego centrifugaron tanto zumo del tallo y pulpa por separado a 2 000 rpm por 10 min, 4 000 rpm por 10 min y 4 000 rpm por 15 min consecutivamente; el sobrenadante obtenido se etiquetó tanto de tallo y de pulpa. Precipitaron usando sulfato de amonio por una noche a 4 °C, luego centrifugaron a 4 000 rpm por 30 min y el pellet obtenido se resolubilizó en 10 ml de tampón Tris HCl 10 mM (pH: 8,0). La concentración de proteína total se determinó mediante el método de Bradford usando como estándar albúmina de suero bovino y la actividad proteolítica utilizando como sustrato p-nitrofenol a pH 4,6; temperatura 25 °C. Obtuvieron 1,4 mg/mL de proteína del extracto crudo y 1,09 mg/mL de proteína purificada del tallo con actividad proteolítica de 1,21 U/mL y actividad específica 1,11 U/mg; para bromelina de fruto fue 5 ± 0,04 mg/mL de extracto crudo; 3,8 ± 0,03 mg/mL de extracto purificado; actividad proteolítica 43,02 U/mL y actividad específica 11,28 U/mg.<sup>27</sup>

El aislamiento de bromelina de la mezcla de: corona, cáscara y núcleo de *Ananas comosus* “piña” cultivares smooth y cayenne; mediante un proceso de ultrafiltración cerámica en Australia, los residuos de “piña” se mezclaron con agua ultra pura frío y se introdujo a una licuadora. El zumo obtenido se filtró a través de una gasa y luego se centrifugó a 10 000 x g a 4 °C por 20 min. El sobrenadante obtenido se guardó a -20 °C. Luego se filtró a través de la membrana cerámica a temperatura controlada y 6,3 a 7,1 de pH. Reportaron resultados 1,7 ± 0,1 mg/ml del extracto crudo; de primer filtrado 1,6 ± 0,1 mg/mL

retenido de primera ultrafiltración  $2,2 \pm 0,1$  mg/mL y de bromelina purificado  $2,5 \pm 0,3$  mg/mL. Luego determinaron la actividad proteolítica de bromelina purificada que fue  $485,4 \pm 2,1$  U/mL con actividad específica de  $194,2 \pm 25,1$  U/mg.<sup>28</sup>

Para la caracterización de bromelina del zumo extraído de corona, pulpa, núcleo y cáscara de tres variedades de “piña” en Nigeria; se centrifugó  $6\ 000 \times g$  por 20 min a  $4\ ^\circ\text{C}$ , el sobrenadante se guardó (extracto crudo) a  $-4\ ^\circ\text{C}$ . Luego se precipitó con etanol gota a gota a  $0\ ^\circ\text{C}$  en fracciones de 30 a 70% (v/v) y se centrifugó a  $10\ 000 \times g$  por 20 min a  $4\ ^\circ\text{C}$ , resuspendiendo el precipitado en tampón fosfato de 0,03 M de pH 7,0. De la variedad local *Ananas comosus* “piña” determinaron el contenido de proteínas del extracto crudo y precipitado de la cáscara, mediante método Bradford: 0,96  $\mu\text{g/ml}$  y 0,59  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente. La actividad proteolítica se determinó utilizando como sustrato azocaseína 0,0094 U/mL en extracto crudo y 0,006 U/mL en extracto precipitado de cáscara de *Ananas comosus* “piña”. La bromelina obtenida tuvo una actividad óptima a  $40\ ^\circ\text{C}$  y pH 7. Por lo tanto, la precipitación con etanol es viable para la recuperación de bromelina.<sup>29</sup>

En la extracción, purificación y caracterización de bromelina de la corona y fruto de “piña” utilizando metanol, etanol y agua destilada, en India; se trituraron en un mortero por separado y luego fueron precipitados con metanol y etanol como también un grupo se diluyó en agua des ionizada después de una noche se centrifugó a 10 000 rpm por 15 min, el sobrenadante se filtró mediante papel Whatman y se guardó a  $4\ ^\circ\text{C}$ . La concentración de enzima se determinó mediante el método de Lowry; usando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. La concentración más alta obtenida 4,161 mg/mL en la muestra de la corona de “piña” y 2,644 mg/mL en la muestra de fruta de “piña” precipitada con metanol respectivamente; así mismo 0,796 mg/mL y 0,508 mg/mL de fruta y corona precipitado con etanol respectivamente.<sup>30</sup>

En la investigación realizada de efectos genotípicos y ambientales sobre el nivel de ácido ascórbico, compuestos fenólicos y la expresión de genes relacionadas durante el desarrollo y maduración de la fruta de *Ananas comosus* “piña”; presentan variaciones importantes en su tasa de respiración y está acompañada de activación concurrente de especies reactivos de oxígeno (ERO) o formación de radicales libres (RL) que puede alterar a nivel celular. Por otro lado los genes involucrados en el sistema activan proteínas enzimáticos y no enzimáticos para disminuir especies reactivos de oxígeno.<sup>31</sup>

## 2.2. *Ananas comosus* “piña”

Es una planta monocotiledónea, herbácea, perenne y tropical que requiere una temperatura promedio de 24 °C para fructificar. Se considera originaria de América del Sur pudiendo ser entre la zona de Brasil y Paraguay, de donde se propagó a otros países del continente, llevada a través de Centro y Sudamérica a México y las Indias Occidentales y posteriormente a Europa y Asia. Expandiéndose más con la llegada de los europeos a España e Inglaterra; en los últimos 100 años, la “piña” se ha convertido en uno de los principales cultivos frutícolas comerciales de los trópicos.<sup>32, 33</sup>

En todas las variedades de *Ananas comosus* “piña”, el fruto es una baya, que se fusiona tempranamente con las adyacentes formando una infrutescencia, grande y de forma ovoide. La flor se transforma en un escudete octogonal de cubierta dura, formada por la fusión del ápice de la bráctea y sépalos, forma la cáscara dura, espinosa y de color verde las que pasan a un color amarillo al madurar el fruto; este fruto es considerado no climatérico y su forma varía de cilíndrico hasta forma piramidal dependiendo la variedad. En el Perú se cultivan principalmente cuatro variedades de las cuales la variedad hawaiana, conocida también como motilona, blanca, lagarto y Guayaquil, es cultivada en Satipo - Junin, Coshñipata-Cusco y VRAEM-Ayacucho; los frutos se comercializan en los mercados de Huamanga y son de tamaño grande con peso promedio de 3,0 kg, contiene pulpa muy frágil, la cáscara de “piña” hawaiana madura es de color verde-amarillo-anaranjado; el mayor defecto del fruto es su maduración des uniforme.<sup>34</sup>

## 2.3. Taxonomía de *Ananas comosus* “piña” Merr., 1917.<sup>35</sup>

Reino	: Plantae
División	: Magnoliophita
Clase	: Liliopsida
Orden	: Poales
Familia	: Bromeliaceae
Género	: Ananas
Especie	: <i>Ananas comosus</i>
Nombre vulgar	: “piña”, “ananas”, “nanas”

## 2.4. Composición química de *Ananas comosus* “piña”

El fruto, presenta una variación muy grande en su composición química, de acuerdo con la época en la que se produce y grado de maduración en el que se encuentra acompañado por el índice de color. Los principios activos se duplican en las últimas semanas de maduración, por lo que los frutos recolectados

prematuramente resultan pobres en nutrientes.<sup>24, 36, 37</sup> El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos publicó recientemente de un total de 905 “piñas” de diferentes variedades, con una muestra de 26 frutas de cada 100 g en extracto crudo reportó azúcar 10% y proteína 0,54 g en promedio, respectivamente.<sup>38</sup> La variedad hawaiana de la selva peruana contiene 12 % de sacarosa en promedio.<sup>34</sup>

La acumulación de azúcares en frutos no climatéricos proviene de la savia y no de la degradación de reservas amiláceas. Durante la maduración del fruto de piña cultivar India, se observó un aumento progresivo en sacarosa alcanzando valores promedio de 14,6% hasta el día 5 después de la cosecha; luego de lo cual disminuyó hasta el día 15 a un valor de 10,57%; apareciendo a partir del día 10 signos de desarrollo de senescencia.<sup>1</sup> Su componente activo es la bromelina, una enzima proteolítica con capacidad de catalizar sustratos específicos.<sup>37</sup> La concentración de bromelina en la pulpa del fruto no cambia al principio de su desarrollo, pero cuando comienza la maduración el contenido de la proteasa aumenta.<sup>39</sup> la fruta fresca al momento de la recolección, porta buena apariencia presentando los cambios más representativos en sus propiedades entre el tercero y el quinto día.<sup>2</sup>

## **2.5. Bromelina de *Ananas comosus* “piña”**

La bromelina del fruto, pertenece al grupo de cisteínas proteasas; el mecanismo catalítico de estas enzimas utilizan a la cisteína como donador de protones.<sup>3</sup> La denominación de bromelina se conocía a la enzima extraída y purificada del tallo de *Ananas comosus* “piña” aunque luego, al detectarse su presencia en el fruto se denominó la primera “*stem bromelain*” y a la segunda “*fruit bromelain*”.<sup>39</sup>

La clasificación por la Comisión de Enzimas (E.C.) en función a su acción catalítica específica: clase 3 hidrolasas, por la actuación sobre enlaces peptídicos subclase 3.4 peptidasas, subsubclase a la que pertenece 3.4.22 cisteína endopeptidasa de las bromeliaceae.<sup>40, 41</sup>

Los desechos de *Ananas comosus* “pina” tales como: el núcleo, la cáscara, la corona y las hojas contienen bromelina en cantidades relativamente menores en comparación al tallo y pulpa de la “piña”.<sup>40</sup> La bromelina una endopeptidasa con peso molecular 33,000 Da y pH óptimo de 5 a 8.<sup>42, 44</sup>

La bromelina semipurificada obtenida del extracto seco/g fue 0,018 g y el rendimiento final de todo el proceso indica, para obtener 1 Kg de bromelina se necesita 19,24 Kg de corazón de “piña”.<sup>36</sup>



En el campo médico la bromelina es empleada en el tratamiento de trastornos digestivos, inflamaciones, infecciones, contra la celulitis y el cáncer.<sup>39</sup> Para estudiar la actividad antitumoral de bromelina fue investigada con preparados semipurificados y aisladas de la pulpa de *Ananas comosus* "piña". Frente al adenocarcinoma mamario-755 se demostró por primera vez en el mundo la actividad antitumoral de la bromelina.<sup>44, 45</sup>

La bromelina se usa como ablandador de carnes, en la fabricación de quesos, preparación de alimentos infantiles, suplementos dietéticos, pretratamiento de soya, tratamiento de pescados y otros productos marinos como la producción de salsa de ostras; fabricación de galletas, sustituto de los sulfitos empleados para impedir el pardeamiento de los jugos de frutos y del vino blanco, para la clarificación de la cerveza, tratamiento del cuero, en la industria textil para el tratamiento de lana y seda.<sup>9</sup>

## **2.6. Método de extracción de bromelina**

La primera etapa en la extracción de bromelina es la liberación de las células que la contienen, que puede ser por ruptura mecánica de los tejidos vegetales: 1) trituración con arena, 2) trituración en mezclador de alta velocidad, 3) homogeneizador a pistón, 4) prensa francesa, 5) sonicación y 6) congelación con nitrógeno líquido y macerado.<sup>46 y 47</sup>

El antes y después de la ruptura del tejido vegetal, con la finalidad de prevenir la desnaturalización y proteólisis durante la extracción; se utilizó algunas técnicas desarrolladas específicamente para extraer moléculas biológicas y son: 1) Utilizar buffer a pH adecuado, 2) extraer con solvente orgánico a 0 °C, 3) trabajar a baja temperatura durante períodos cortos de tiempo.<sup>10, 42 y 48</sup>

Cuando la temperatura se minimiza a 4 °C durante el proceso de extracción, disminuye la desnaturalización y reduce la activación de la capacidad enzimática de bromelina. Pero la exposición de la enzima a bajas temperaturas puede dar lugar a la inactivación debido a la cristalización del solvente, usar buffers de pH por encima o por debajo del óptimo, adicionar EDTA (5 mM) para remover cationes bivalentes que son cofactores de metalopeptidasas.<sup>28, 49</sup>

### **2.6.1. Extracción alcohólica**

El proceso de extracción alcohólica, consiste en la transferencia de un solvente orgánico denominado etanol, al zumo del tejido vegetal miscible o parcialmente miscible; al ponerlos en contacto estas dos sustancias se mezclan.<sup>49</sup>

La técnica se basa en la disminución de la solubilidad mediante la adición de un solvente orgánico (etanol). El agua se caracteriza por su alta constante

dieléctrica, lo cual significa que los iones en solución acuosa presentan interacciones más débiles que con otros medios. La adición de un solvente orgánico (etanol) 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.<sup>11, 49</sup>

La temperatura tiene un efecto importante en el proceso de aislamiento y precipitación de proteína, principalmente cuando se usa etanol como solvente. Se han realizado pruebas para evaluar la variación de temperatura con el tiempo al momento de añadir etanol al zumo de *Ananas comosus* "piña". La variación de temperatura en el zumo de "piña" en función del tiempo de contacto con etanol, al añadir gota a gota 90% (v/v), la temperatura más alta registrada es 5,2 °C. Luego de 2 min la temperatura disminuye a 1,0 °C. Adecuada para aislar y precipitar proteínas sin desnaturalización.<sup>23</sup>

La adición de etanol en una sola aplicación puede conducir a la desnaturalización de enzimas formando "bolsillos" de etanol en la solución, incluso si la temperatura está por debajo de la temperatura crítica (> 10 °C). Por esta razón, la adición de etanol se realiza con tres aplicaciones consecutivas durante 2 minutos. Con la adición de etanol al 20 % (v/v) (cero minutos), la temperatura más alta registrada es 4,8 °C. Después de un minuto, la temperatura disminuye a 2,2 °C y cuando la concentración de etanol se completa al 50 % (v/v), la temperatura más alta alcanza 3,7 °C, una reducción del 21 % de la temperatura después de la adición de la primera alícuota de etanol; luego de dos minutos la temperatura disminuye a 1,7 °C y cuando la concentración de etanol se completa al 90 % (v/v), la temperatura continua disminuyendo hasta 0,1 °C en aproximadamente siete minutos y se estabiliza.<sup>23, 49</sup>

Para mejorar el proceso de extracción de bromelina, la prueba de precipitación realizada con fracciones de 30 a 70 % (v/v) de etanol posibilita aislar y precipitar toda la proteína (100 %) y es considerable para una técnica con un bajo poder de purificación.<sup>26 y 50</sup>

## **2.7. Método de medición de concentración de proteína**

### **2.7.1. Técnica de biuret modificado por Robinson**

Es un método colorimétrico para la cuantificación de proteínas, que puede definirse como una reacción de cualquier compuesto químico orgánico que

contenga 2 o más grupos carbamilo (CO-NH<sub>2</sub>) que se unan directamente entre sí o mediante un sólo átomo de nitrógeno o carbono que en una solución alcalina da un color púrpura complejo en la adición de sal de cobre; esta rigurosa técnica química ha impedido el uso rutinario del método Kjeldahl en la mayoría de los laboratorios. Todas las proteínas solubles dan la reacción de biuret.<sup>51</sup>

### **Reactivos**

Sulfato de Cobre Pentahidratado (CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O) 1,5 g

Tartrato de Sodio y Potasio (NaKC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> · 4H<sub>2</sub>O) 6,0 g

Disolver en 500 mL de agua destilada y añadir 300 mL de NaOH al 10%

Mezclar y agregar 1 g de Yoduro de Potasio y enrazar hasta 1000 mL.

### **Procedimiento<sup>52</sup>**

1. Tomar 1 mL de la muestra diluida (1/1000 mL) en un tubo de prueba de 10x100 mm y añadir 4 mL de reactivo de biuret modificado.
2. Paralelamente preparar blanco, con 1 mL de agua destilada.
3. Leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 554 nm.



### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Ubicación

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho a 2,761 msnm.

#### 3.2. Población

Se consideró *Ananas comosus* “piña” variedad hawaina proveniente del distrito de Sivia provincia de Huanta - VRAEM, comercializada en el Mercado de la Asociación de Comerciantes “Nery García Zárate” del distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho.

**Muestreo:** Por conveniencia

#### 3.3. Muestra

15 Unidades de frutos de *Ananas comosus* “piña” de variedad hawaiana de diferentes grados de madurez, cinco “piñas” inmaduras (IM), cinco “piñas” maduras (M), cinco “piñas” posmaduras (PM); de camiones que comercializan “piñas” provenientes de Sivia-VRAEM en el Mercado de la Asociación de Comerciantes “Nery García Zárate” en horas de la mañana (05 a 06 a.m.) en el distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga.

Se verificó que la cáscara del fruto de *Ananas comosus* “piña”, esté sana y sin lesiones físicas o causadas por patógenos o insectos.

Los frutos comprados fueron trasladados al Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga, lugar donde se procesó de manera adecuada.

#### 3.4. Metodología

##### 3.4.1. Desinfección con etanol al 70%

La desinfección se realizó mediante método de Soares et al.<sup>23</sup>

- Se lavaron los frutos enteros con agua corriente para retirar los residuos, con la ayuda de una escobilla de cerda suave.
- Se sumergieron en etanol al 70% a 4 °C por 2 min.
- Se enjuagaron 5 veces con agua destilada estéril a 4 °C.
- Se sumergieron en etanol al 70% a 4 °C por 1 min.
- Se enjuagaron 10 veces con agua destilada estéril a 4 °C.

#### **3.4.2. Preparación del extracto crudo**

- La extracción se realizó mediante el método de Wan *et al*<sup>10</sup> y Soares *et al*.<sup>23</sup>
- Para preparar el extracto crudo, la cáscara se separó manualmente de la fruta.
- Se pesaron 140 g de la cáscara extraída, luego se pusieron en bolsas herméticas que fueron congeladas a -10 °C por 24 h.
- Se añadieron 35 mL de tampón de extracción (tampón fosfato de sodio 0,02 M de pH 7,0 conteniendo EDTA 5 mM) a 4 °C, en una proporción de 4: 1, se mantuvo por 5 min.
- Luego se introdujo al extractor de frutas de dos tiempos (marca Prima, Alemania).
- El zumo obtenido se filtró a través de una gasa estéril. Luego se dispensó en 4 tubos Falcon de 15 mL y rápidamente se introdujo a un vaso de precipitado, que contenía hielo a temperatura de 0 °C.
- La muestra se centrifugó a 200 x g por 20 min en una centrífuga (marca P-selecta Ref-s-240, Alemania) y el sobrenadante obtenido se guardó en un tubo Falcon de 50 mL a -10 °C para utilizarlo posteriormente.

#### **3.4.3. Extracción de bromelina mediante precipitación con etanol**

- Se dispensó a un tubo Falcon de 15 mL: 4,5 mL de extracto enzimático crudo y se añadió gota a gota etanol al 99,8 % en un volumen total de 1,1 mL a 0 °C (tiempo cero).
- Se siguió añadiendo 0,9 mL de etanol al cabo de 30 s.
- Pasado 2 min se agregó 2,5 mL del mismo solvente para aproximarse a 50% (v/v) de etanol en la disolución.
- Después de 3 min se añadió una alícuota de 6 mL de etanol absoluto para llegar al 70 % (v/v) de etanol en la disolución y se esperó de 15 a 30 min para la precipitación.
- Pasado los 30 min, se centrifugó a 200 x g por 20 min, luego se eliminó el sobrenadante.

- El precipitado obtenido se solubilizó en 1,5 mL de tampón de fosfato de sodio (0,02 M, pH 7.0) y se almacenó a -10 °C. Lo que se usó para la determinación de concentración total de proteínas y actividad enzimática.

#### **3.4.4. Curva patrón o curva de calibración**

Se usó el método de biuret modificado por Robinson.<sup>13, 52</sup>

- Se colocaron en una gradilla 6 tubos de ensayo de 10x100 mm, se adicionó a cada uno de ellos 1 mL de solución de albúmina de suero bovino a una concentración de 10, 8, 6, 4, 2 mg/mL y al último tubo 1 mL de agua destilada (blanco reactivo).
- Luego se añadió 4 ml de reactivo de biuret modificado por Robinson y se agitó.
- Se dejó reposar durante 5 min a temperatura ambiente.
- Se ajustó a cero de absorbancia con la solución blanco reactivo.
- Se procedió a medir la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 554 nm, de las diferentes soluciones de proteínas en el orden creciente.
- Se ajustó los datos obtenidos por el método de regresión lineal.

#### **3.4.5. Medición del contenido de proteínas**

La determinación de proteína total del extracto se realizó mediante el método de biuret modificado por Robinson.<sup>13, 52</sup>

- Se usó el espectrofotómetro marca Thermo Scientific™ 840 a una longitud de onda de 554 nm.
- Se colocaron en una gradilla 3 tubos de ensayo de 10x100 mm y se adicionó 1 mL del extracto crudo al primero, 1 mL de la proteína precipitada con etanol al segundo, al tercero 1 mL de agua destilada.
- Luego se añadió 4 ml de reactivo de biuret modificado por Robinson y se agitó.
- Se dejó reposar durante 5 min a temperatura ambiente.
- Se ajustó a cero de absorbancia con la solución blanco reactivo.
- Se procedió a medir la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 554 nm, de las proteínas en solución.
- Se determinó la concentración de proteínas usando la curva de calibración.

#### **3.4.6. Determinación de la actividad enzimática**

Se utilizó albúmina de suero bovino como sustrato.

La prueba se realizó mediante el método de biuret modificado por Robinson.<sup>20, 52</sup>

### 3.4.7. Procedimiento de prueba de catálisis

- En un tubo Eppendorf de 1,5 mL de capacidad se disolvió: 390 µL de proteína precipitada con etanol, la cual fue solubilizada en 610 µL de buffer de pH 7,0.
- Se termostataron los reactivos a la temperatura de ensayo (37 °C) por 5 min.
- Se colocó 1 mL de solución de albúmina y 1 mL de solución de bromelina comercial y proteína precipitada con etanol en tubos de 10x100 mm y se dejó reaccionar a 37 °C durante 60 min.
- Se detuvo la reacción con 2 mL de ácido tricloroacético (ATA).
- Se dejó reposar el precipitado formado por 5 min.
- Para el tubo testigo, se mezcló 1 mL de bromelina comercial y proteína precipitada con etanol, se añadió 1 mL de sustrato y 2 mL de ácido tricloroacético. Se dejó reposar por 5 min.
- Se centrifugó los tubos testigo y problema a 18 x g por 3 min.
- Se descartó el sobrenadante.
- Al precipitado se trató con el método de biuret modificado por Robinson.
- Se leyó la absorbancia a 554 nm en el espectrofotómetro marca Thermo Scientific™ 840.

#### Cálculos<sup>20</sup>

$$AP = \frac{\left[ \frac{(Abs_t - Abs_p) - Clin}{Cang} \right] x FD x V_{reactor}}{MMPD x t_i x V_m}$$

Dónde:

AP: actividad proteolítica

Abs<sub>t</sub>: absorbancia testigo

Abs<sub>p</sub>: absorbancia problema

Clin: coeficiente lineal de curva patrón

Cang: coeficiente angular de curva patrón

FD: factor de dilución

V<sub>reactor</sub>: volumen de reactor

V<sub>m</sub>: Volumen de muestra

MM<sub>PD</sub>: masa molecular de la proteína degradada

t<sub>i</sub>: tiempo de degradación de proteína



La actividad específica (AE) se expresó como unidades de enzima por contenido de proteína total, de acuerdo:

$$As = \frac{Ap}{Pt}$$

Dónde:

AE: actividad específica

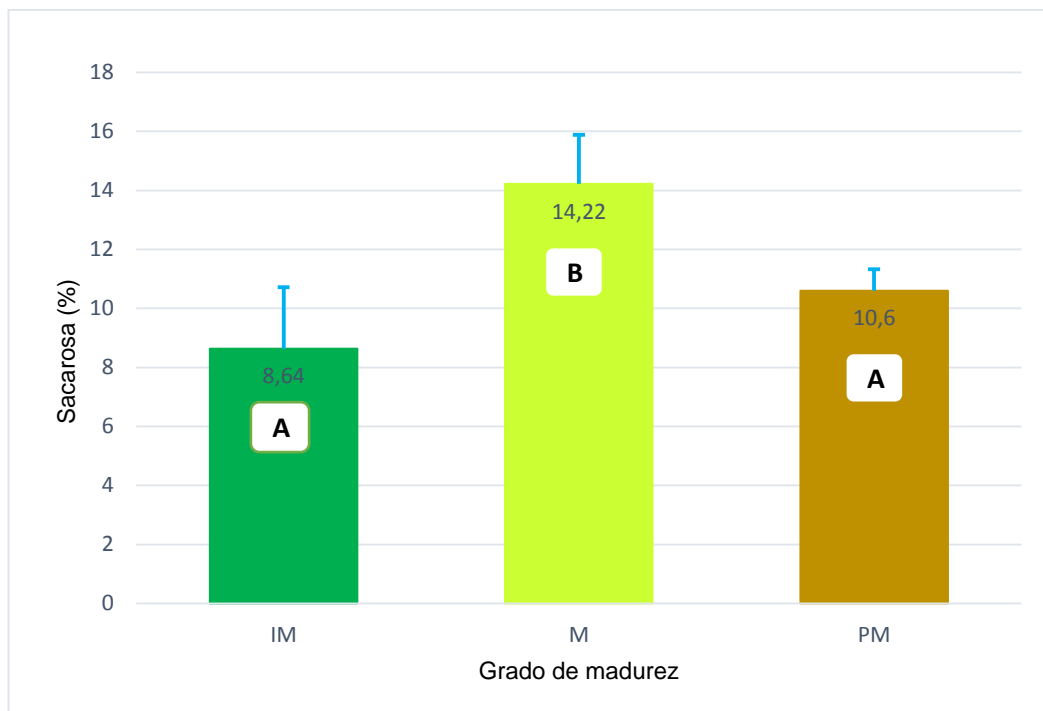
AP: actividad proteolítica

PT: concentración total de proteína



#### **IV. RESULTADOS**





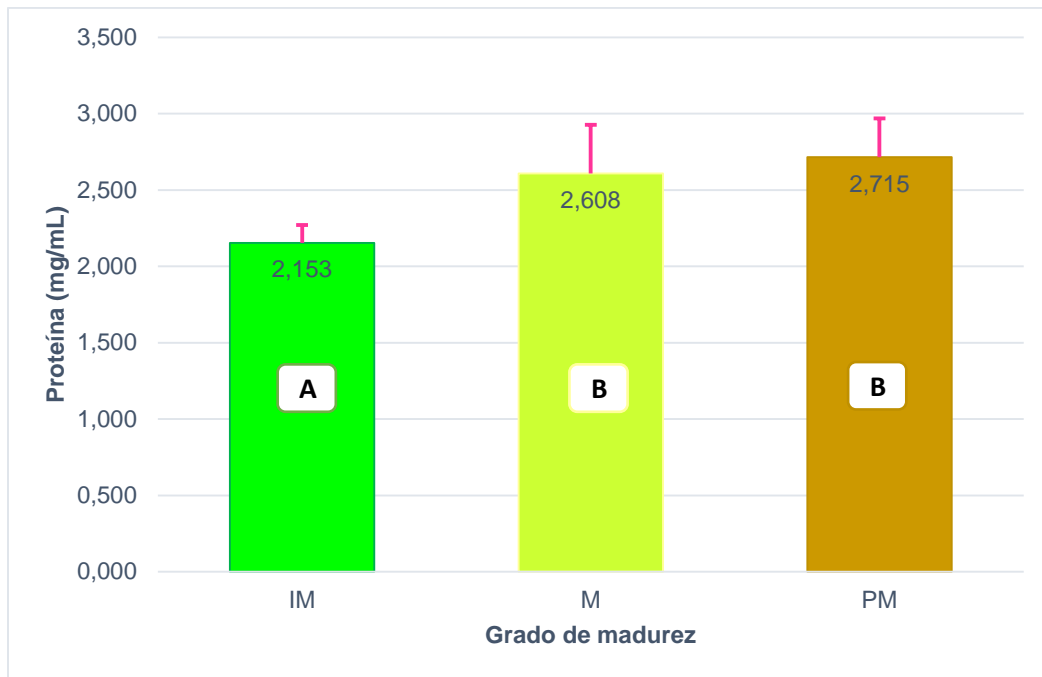
**Figura 1.** Porcentaje de sacarosa en cáscara de *Ananas comosus* “piña” de variedad hawaiana del mercado “Nery García Zárate” procedente de Sivia-VRAEM, determinado por refractometría en el Laboratorio de Biotecnología-UNSCH. Ayacucho, 2019.

Dónde:

IM: cáscara de frutos inmaduros o de color verde

M: cáscara de frutos maduros o de color amarillo-verdoso

PM: cáscara de frutos posmaduros o de color naranja-marrón



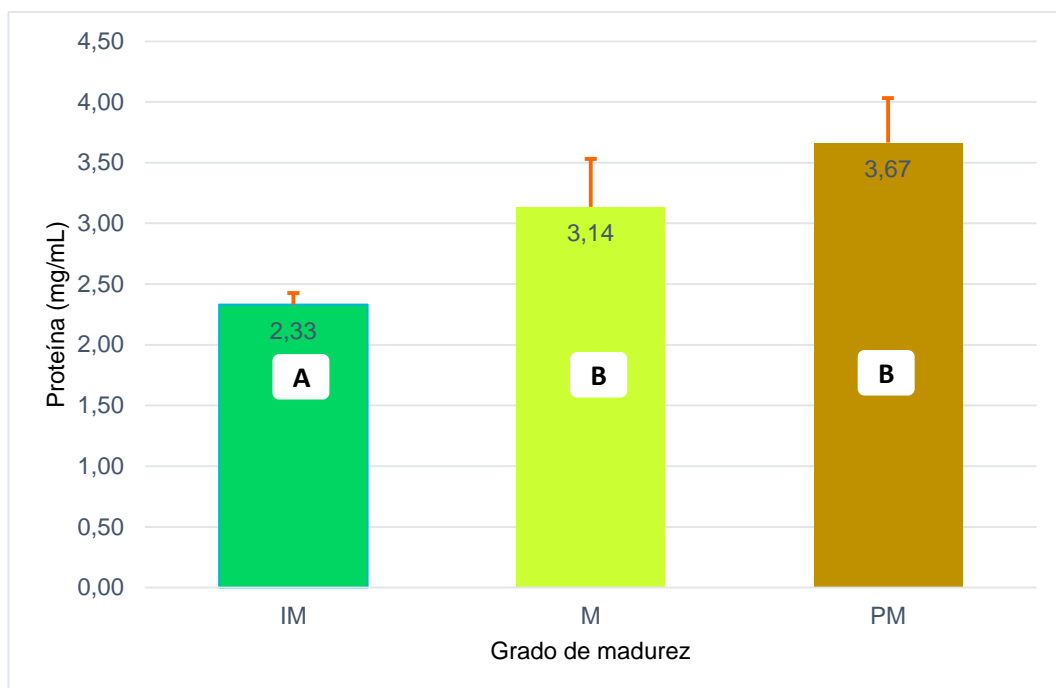
**Figura 2.** Proteínas del extracto crudo de cáscara de *Ananas comosus* “piña” variedad hawaiana del mercado “Nery García Zárate” procedente de Sivia–VRAEM, determinadas por el método de biuret modificado por Robinson en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas UNSCH, 2019.

Dónde:

IM: cáscara de frutos inmaduros o de color verde

M: cáscara de frutos maduros o de color amarillo-verdoso

PM: cáscara de frutos posmaduros o de color naranja-marrón



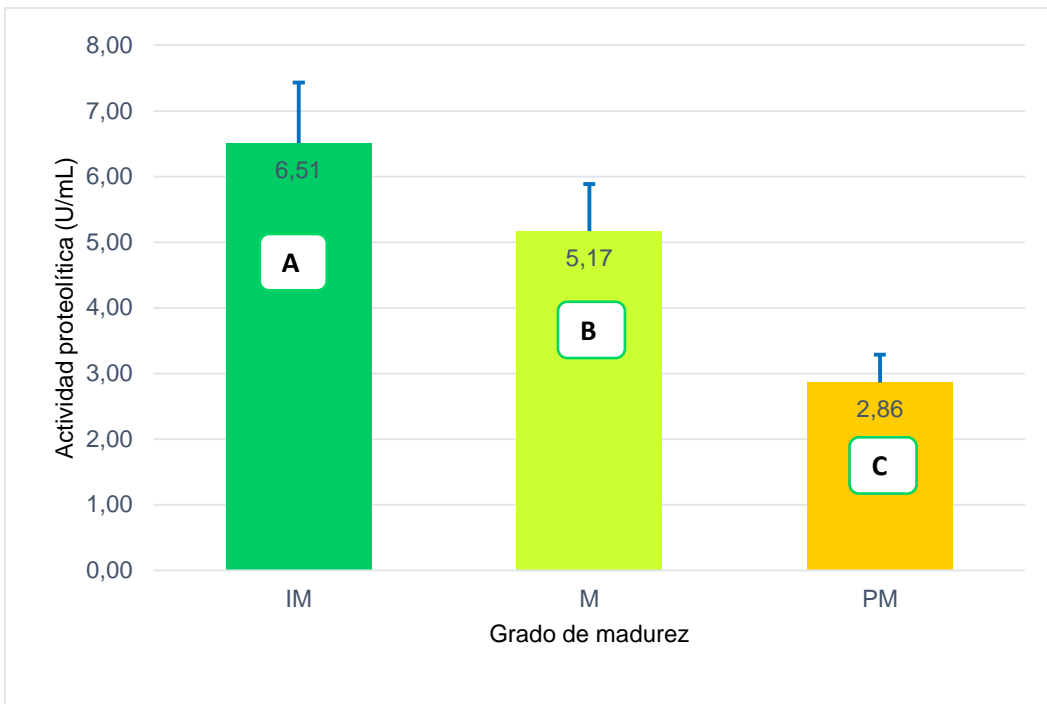
**Figura 3.** Proteína aislada y precipitada con etanol de cáscara de *Ananas comosus* “piña” variedad hawaiana procedentes de Sivia–VRAEM, determinadas por el método de biuret modificado por Robinson en el Laboratorio de Biotecnología-UNSCH, 2019.

Dónde:

IM: cáscara de frutos inmaduros o de color verde

M: cáscara de frutos maduros o de color amarillo-verdoso

PM: cáscara de frutos posmaduros o de color naranja-marrón



**Figura 4.** Actividad proteolítica de proteína aislada y precipitada con etanol de cáscara de *Ananas comosus* “piña” variedad hawaiana, procedente de Sivia-VRAEM comercializadas en el mercado Nery García Zárate, determinadas por proteólisis de albúmina de suero bovino (BSA) con el método de biuret modificado por Robinson en Laboratorio de Biotecnología de la UNSCH. Ayacucho, 2019.

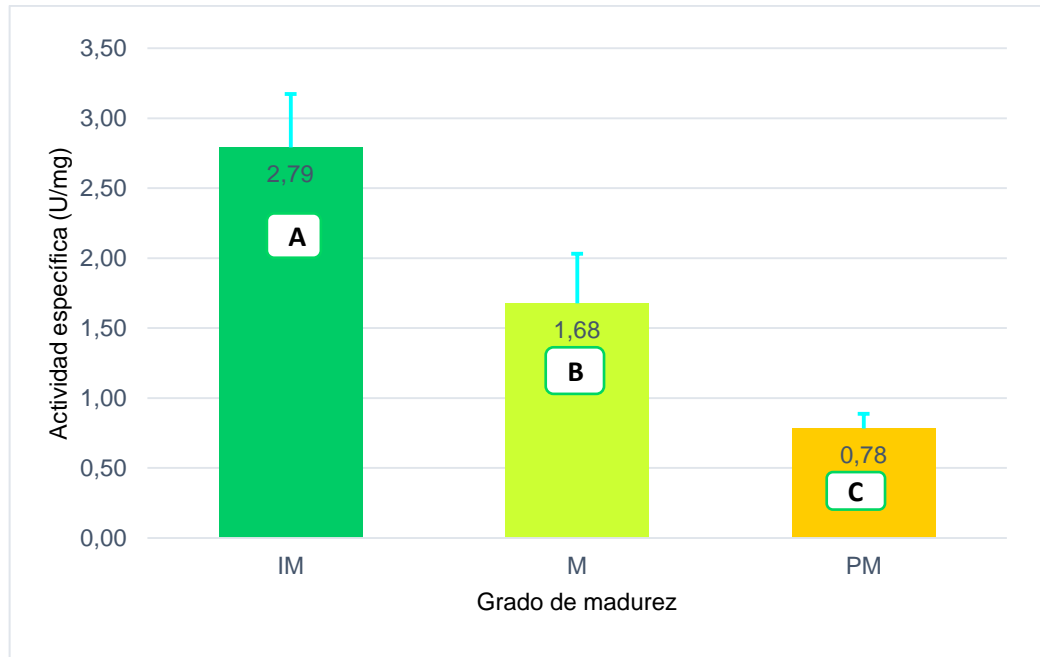
Dónde:

IM: cáscara de frutos inmaduros o de color verde

M: cáscara de frutos maduros o de color amarillo-verdoso

PM: cáscara de frutos posmaduros o de color naranja-marrón





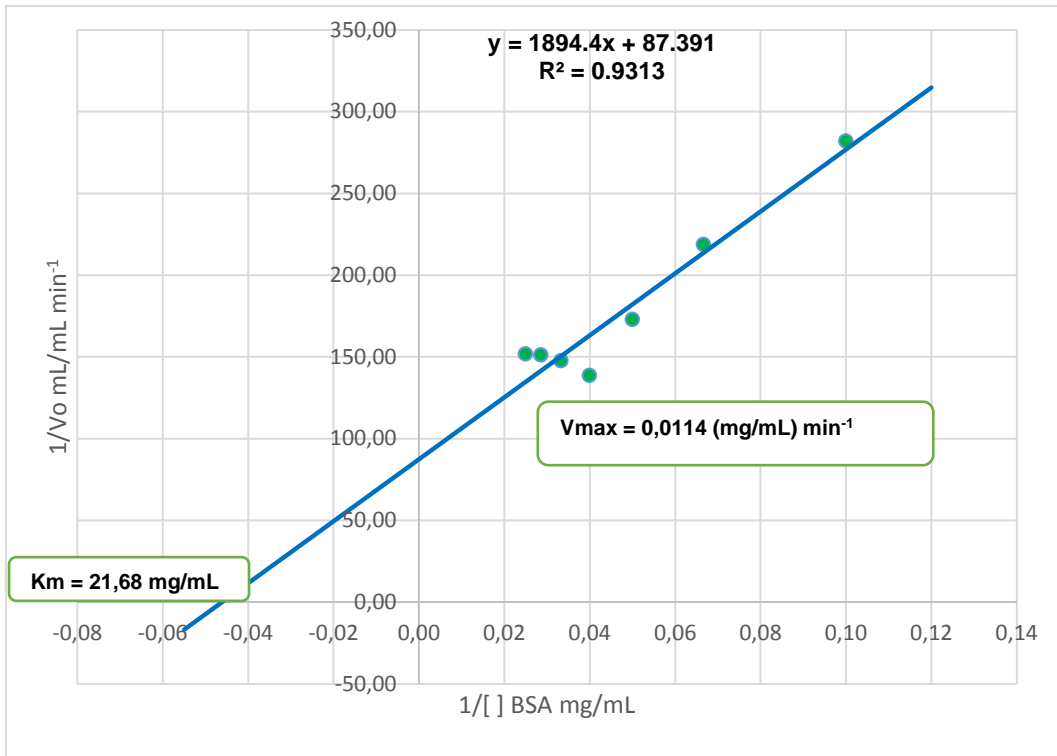
**Figura 5.** Actividad específica de proteína aislada y precipitada con etanol de cáscara de *Ananas comosus* “piña” variedad hawaiana procedente de Sivia-VRAEM. Ayacucho, 2019.

Dónde:

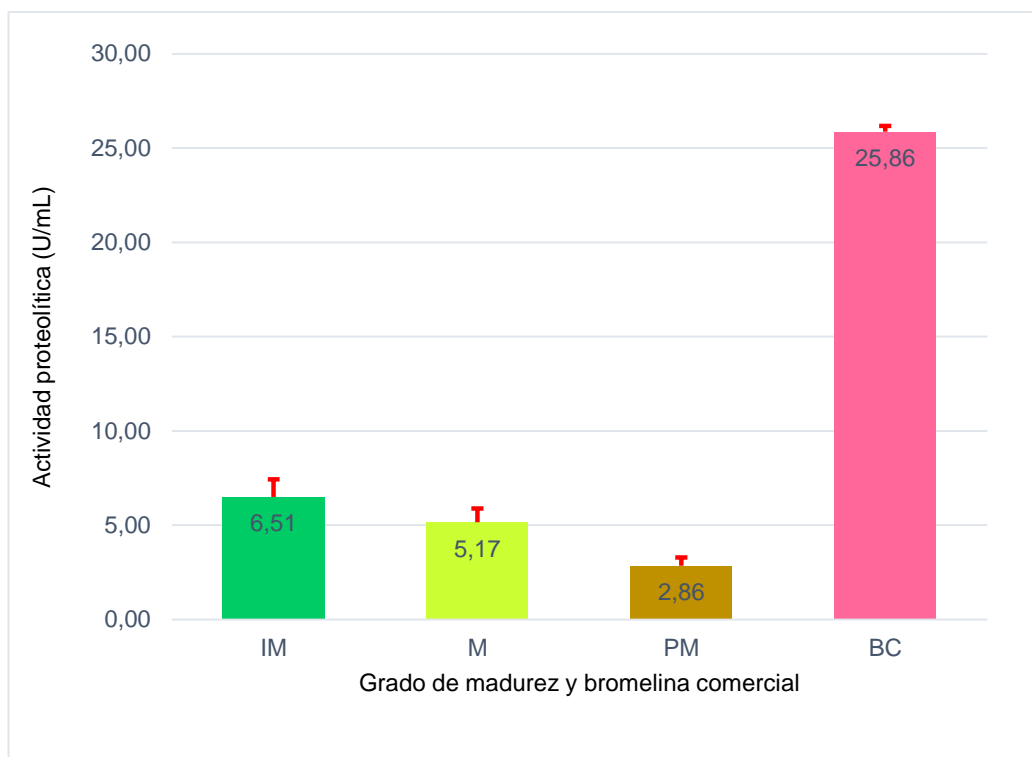
IM: cáscara de frutos inmaduros o de color verde

M: cáscara de frutos maduros o de color amarillo-verdoso

PM: cáscara de frutos posmaduros o de color naranja-marrón



**Figura 6.** Modelo de Lineweaver – Burk, con la que, se calculó la  $V_{max}$  y  $K_m$  de la bromelina obtenida de la cáscara de *Ananas comosus* “piña”. Ayacucho, 2019.



**Figura 7.** Actividad proteolítica de bromelina comercial y proteína aislada y precipitada con etanol de cáscara de *Ananas comosus* "piña" variedad hawaiana del VRAEM-Sivia. Laboratorio de Biotecnología de Facultad de Ciencias Biológicas-UNSCH, 2019.

Dónde:

BC: bromelina comercial

IM: cáscara de frutos inmaduros o de color verde

M: cáscara de frutos maduros o de color amarillo-verdoso

PM: cáscara de frutos posmaduros o de color naranja-marrón



## V. DISCUSIÓN

Las características fisicoquímicas de las cáscaras de *Ananas comosus* “piña”, para establecer la diferencia entre los estados de madurez fue el porcentaje (%) de sacarosa del extracto crudo (EC) como indicador. En la Figura 1, se muestra los valores de sacarosa obtenida de la cáscara de *Ananas comosus* “piña” variedad Hawaina en % de frutas inmaduras (IM)  $8,64 \pm 2,1$ ; maduras (M)  $14,22 \pm 1,7$  y posmaduras (PM)  $10,86 \pm 1,0$ ; existe diferencia significativa entre las medias de IM, M y PM, con un nivel de confianza de 95 % con  $P < 0,05$  ( $P = 0,000$ ); al someter a la prueba de comparación múltiple de Tukey con un N.C. de 95 %, los promedios en porcentaje de sacarosa de cáscara de frutos de *Ananas comosus* “piña” M es más alto y significativamente diferente respecto a la de IM y PM que son iguales.

Se reportó resultados de los parámetros fisicoquímicos evaluados de “piña” variedad esmeralda en las que se observaron variaciones significativas ( $p < 0,05$ ) de los parámetros fisicoquímicos a lo largo del proceso de maduración. Los valores de  $L^*$  (intensidad del color) fueron disminuyendo, resultado de la pérdida de luminosidad y un aumento en color amarillo  $b^*$  (zona de variación entre el rojo y verde del espectro) característico de la pulpa de la “piña” durante la maduración; la media del porcentaje de sacarosa para M1 = 14,86; M2 = 16,53; M3 = 16,40; M4 = 16,12 respectivamente, sólo fue significativamente diferente para grado de madurez (M1) respecto a los demás estados de maduración con un nivel de confianza de 95 %.<sup>19</sup>

Los °Brix de “piñas” de variedad perolera  $8,64 \pm 0,26$  para “piñas” de 12 meses y  $10,03 \pm 0,23$  para “piñas” de 18 meses; con un nivel de confianza de 97% fueron indicadores físico-químicas para diferenciar entre un estado de madurez y otro.<sup>24</sup> La acumulación de azúcares en frutos no climatéricos proviene de la savia. Durante la maduración del fruto de piña aumentó progresivamente en los

azúcares alcanzando valores promedio de 14,6% el día 5 hasta el día 15, después de lo cual disminuyó.<sup>1</sup>

En la Figura 2, se reporta la concentración de proteínas obtenidas del extracto crudo de cáscara de *Ananas comosus* “piña”, de frutos inmaduros (IM) =  $2,15 \pm 0,12$  mg/mL; frutos maduros (M) =  $2,61 \pm 0,32$  mg/mL y frutos posmaduros (PM) =  $2,72 \pm 0,30$  mg/mL respectivamente, obteniendo en las cáscaras de frutos posmaduros y maduros mayor concentración de proteínas respecto a los frutos inmaduros. El análisis realizado con ANVA respecto a promedios de los mismos con un  $P = 0,008 < 0,05$  del valor  $\alpha$  que indica hay suficiente evidencia estadística para afirmar que existe diferencia significativa de concentración de proteínas de cáscara de *Ananas comosus* “piña” inmaduras respecto a maduras y posmaduras.

En la Figura 3, se muestra la concentración de proteínas precipitadas con etanol de los frutos inmaduros (IM) fue  $2,33 \pm 0,10$  mg/mL; maduros (M)  $3,14 \pm 0,40$  mg/mL y posmaduros (PM)  $3,67 \pm 0,36$  mg/mL diferenciándose significativamente con un nivel de confianza de 95 % y con un P valor ( $P = 0,001$ )  $< \alpha = 0,05$  de proteínas extraídas de cáscaras de *Ananas comosus* “piña” posmaduras y maduras respecto de “piñas” inmaduras, esto se debe al desarrollo fisiológico en el que se sintetizan proteínas dentro de su composición, incluyendo la enzima.

En la investigación realizada en la Universidad de Paraíba, la determinación de concentración proteico del extracto crudo del cultivar Imperial, tuvo en la cáscara 10,4 mg/mL de proteína.<sup>15</sup> La cáscara de “piña” de variedades Nang Lae (NL) y Phu Lae (PL) en Tailandia, tuvo mayor concentración de proteína de  $0,702 \pm 0,01$  mg/mL del extracto crudo de la variedad NL;  $0,625 \pm 0,02$  mg/mL de la variedad PL.<sup>16</sup> En el estudio experimental de extracción de bromelina de “piña” variedad perolera, cultivados *in vitro* bajo diferentes condiciones de micropropagación en Sao Paulo; la mayor concentración de bromelina hallada fue de 18,379 mg/mL.<sup>20</sup>

La concentración de bromelina del extracto crudo y precipitado con etanol, extraída de la cáscara de “piña” variedad perolera fue  $0,23 \pm 0,01$  mg/mL en el extracto crudo y  $0,10 \pm 0,02$  mg/mL de bromelina precipitado.<sup>23</sup> Así mismo se determinó la concentración de bromelina del extracto crudo y precipitado de la pulpa de *Ananas comosus* “piña” variedad perolera, para fruta de 12 meses fue 0,23 mg/mL en extracto crudo y 0,14 mg/mL en purificado; para “piña” de 18

meses 0,32 mg/mL en extracto crudo y 0,2 mg/mL en purificado. Con un nivel de confianza de 95 % con un  $P = 0,004 < \alpha = 0,05$  se diferenciaron significativamente a favor de “piñas” de 18 meses.<sup>24</sup>

La cáscara de *Ananas comosus* “piña” variedad Pearl en Brasil se usó como fuente principal de bromelina; el contenido total de proteínas obtuvieron 0,25 mg/mL en el extracto crudo y 0,31 mg/mL de proteína en el extracto precipitado con sulfato de amonio.<sup>25</sup>

No existe diferencia respecto al grado de madurez de fruto de *Ananas comosus* “piña” con la concentración de proteína, pero, Heinicke & Gortner reportaron que la concentración de bromelina en la pulpa del fruto no cambia al principio de su desarrollo, pero cuando comienza la maduración el contenido de la proteasa aumenta. Según Omar *et al*, la bromelina se transformaría en otra proteína con un papel metabólico distinto del inicial, los mismos encontraron mayor concentración de proteínas en frutos maduros que en inmaduros.<sup>39</sup>

En la Figura 4, se observa la actividad proteolítica (AP) en unidad de enzima por mililitro (U/mL) de bromelina precipitada con etanol de la cáscara de *Ananas comosus* “piña” de variedad hawaiana en la que las cáscaras extraídas de frutos inmaduros (IM) fue de  $6,51 \pm 0,92$  U/mL; maduros (M) =  $5,17 \pm 0,72$  U/mL y posmaduros (PM) mostraron actividad proteolítica más baja respecto a los que anteceden  $2,86 \pm 0,43$  U/mL, estos resultados fueron corroborados por ANOVA con un nivel de confianza de 95 %, con P valor ( $P = 0,000$ ) < al nivel de significancia  $\alpha = 0,05$ ; el mismo que indica, existencia de suficiente evidencia estadística significativa de diferencia de medias; también se sometió a la prueba múltiple de Tuckey, en la que, la media de actividad proteolítica (AP) de bromelina de la cáscara de *Ananas comosus* “piña” IM, M y PM expresadas en U/mL son significativamente diferentes. La bromelina de cáscara de frutos inmaduros (IM) presentan mayor actividad proteolítica, seguido por maduros (M) y luego los posmaduros (PM).

En la Figura 5, se reporta la actividad específica (AE) de la bromelina precipitada con etanol en fracciones de 20 a 70%, el promedio expresado para bromelina de la cáscara de frutos inmaduros (IM) fue  $2,79 \pm 0,38$  U/mg de digestión de albúmina sérica bovina (BSA), para frutos maduros (M) =  $1,68 \pm 0,35$  U/mg y de cáscara de frutos posmaduros (PM) =  $0,78 \pm 0,11$  U/mg, resultando con ANOVA al 95 % de nivel de confianza con suficiente evidencia estadística significativa la existencia de diferencia de medias con un P valor ( $p = 0,000$ ) <  $\alpha = 0,05$ ,

corroborado con pruebas múltiples de Tukey, indicando que todas las medias son significativamente diferentes respecto uno al otro. Todo ello se debe al grado de madurez alcanzado en función del índice de color exterior de la “piña”, como indicador de madurez del mismo, comúnmente usado para la cosecha como para la comercialización. La actividad proteolítica de bromelina de la cáscara de los frutos inmaduros es significativamente diferente a la actividad proteolítica de frutos maduros pese a que ambos alcanzaron su desarrollo, en relación a la diferencia significativa de actividad proteolítica para los frutos posmaduros, podría deberse a la fermentación y degradación lenta de los mismos por lo que López *et al*, citan a Omar *et al*, para referir a la transformación de bromelina en otra proteína con un papel metabólico distinto del inicial.<sup>39</sup>

La actividad enzimática presente en el sobrenadante del extracto crudo, precipitado por fracciones de etanol 30 a 70 % (v/v), la bromelina tuvo actividad proteolítica de  $2,82 \pm 0,04$  U/mL con actividad específica de  $28,20 \pm 12,15$  a 37 °C a pH óptimo 5 a 6 a un nivel de confianza de 95 %.<sup>23</sup> En similares investigaciones realizadas, a partir de residuos de “piña” resultó tener actividad proteolítica de 15,96 U/mL a 50 °C a un pH óptimo de 6 a 7.<sup>26</sup> Así mismo, en otra investigación se obtuvo una actividad proteolítica de 0,014 U/mL, con actividad específica de 0,0095 U/mg a un óptimo de temperatura de 40 °C a pH 7.<sup>29</sup>

En la Figura 6, se muestra el modelo matemático de Lineweaver Burk para determinar Km y Vmax, de bromelina obtenida de cáscara de *Ananas comosus* “piña”, se determinó Km: 21,68 mg/mL y Vmax: 0,01143 (mg/mL) min<sup>-1</sup>. El valor de Km es la afinidad que tiene la enzima con el sustrato (albúmina de suero bovino), cuando el valor es menor, la afinidad es mayor. Vmax es la mayor velocidad que bromelina alcanzó cuando se incrementó progresivamente la concentración de sustrato.

A partir de pulpa de *Ananas comosus* “piña” de variedad perolera, trabajando a pH 6, con sustrato (caseína) y a temperatura ambiente obtuvieron valores de Km 0,0016 M y Vmax 0,000983 M/seg.<sup>22</sup>

La Figura 7, permite observar la actividad proteolítica de bromelina comercial a partir de tallo: 25,86 U/mL y bromelina de cáscara aislada y precipitada con etanol: 6,51 U/mL de la “piña” inmadura, esta diferencia podría deberse a: el origen de la enzima, desnaturalización parcial de la enzima al momento de aislarla y no haber considerado optimizar parámetros de actividad enzimática.



## VI. CONCLUSIONES

1. El estado de madurez de *Ananas comosus* “piña” fue determinado por el porcentaje de sacarosa considerando a las frutas inmaduras (IM)  $8,64 \pm 2,1$  %; frutas maduras (M)  $14,22 \pm 1,7$ % y frutas posmaduras (PM)  $10,6 \pm 1$  %.
2. La concentración de proteína del extracto crudo de la cáscara de *Ananas comosus* “piña” de fruta: IM  $2,15 \pm 0,12$  mg/mL; M  $2,61 \pm 0,32$  mg/mL y PM  $2,72 \pm 0,3$  mg/mL.
3. La concentración de proteína aislada y precipitada con etanol: en fruta IM  $2,33 \pm 0,10$  mg/mL; M  $3,24 \pm 0,40$  mg/mL y PM  $3,67 \pm 0,36$  mg/mL.
4. La actividad proteolítica (AP) de proteína aislada y precipitada con etanol de cáscara de *Ananas comosus* “piña” de fruta IM  $6,51 \pm 0,92$  U/mL; M  $5,17 \pm 0,72$  U/mL y PM  $2,86 \pm 0,43$  U/mL.
5. La  $V_{max}$  de proteína aislada y precipitada con etanol de cáscara de *Ananas comosus* “piña” tuvo  $0,01144$  (mg/mL)  $\text{min}^{-1}$  y  $K_m$   $21,68$  mg/mL.



## VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios de distintos métodos de extracción para determinar el más eficaz para la obtención de bromelina de cáscara de *Ananas comosus* “piña” de variedad hawaiana, además de un estudio con almacenamiento de las muestras a -18°C.
2. Purificar la bromelina a partir de cáscara de *Ananas comosus* “piña” variedad hawaiana.
3. Optimizar los parámetros de la actividad de bromelina como pH, temperatura y concentración de sustrato.



## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Morales M, Hernández M, Cabezas M, Barrera J, Martínez O. Caracterización de la maduración del fruto de “piña” nativa (*Ananas comosus*). *Agronomía Colombiana* [revista en línea]\* 2001. [Acceso 20 de octubre de 2019]; 18(2). Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/21706>.
2. García Y, García A, Hernández A y Pérez J. Estudio de la variación del Índice de Color durante la conservación de la “piña” variedad cayena lisa a temperatura ambiente. *Ciencias Técnicas Agropecuarias* [revista en línea]\* 2011. [Acceso 20 de octubre de 2019]; 20(4). Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2071-00542011000400002](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2071-00542011000400002).
3. Vicente F, Lario L, Pessoa A, Ventura S. Recovery of Bromelain from pineapple stem residues using aqueous micellar two-phase systems with ionic liquids as co-surfactants. *Process Biochemistry* [revista en línea]\* 2016 setiembre 2015 – enero 2016. [Acceso 25 de octubre de 2016]; 29(3). Disponible en: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.procbio.2016.01.004>.
4. Obregón W. Introducción al mundo de las proteasas [Sede web], [sedici.unlp.edu.ar](http://sedici.unlp.edu.ar); 2010 [Acceso 11 de junio de 2018]. Disponible en: [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2249/Introducci%C3%B3n\\_a\\_l\\_mundo\\_de\\_las\\_proteasas.pdf?sequence=5](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2249/Introducci%C3%B3n_a_l_mundo_de_las_proteasas.pdf?sequence=5).
5. Rowan A. *MEROPS name Stem Bromelain*: [CD-ROM]. 3rd Ed. Reino Unido: Elsevier; 2013.
6. Piñeiro E. La bromelina de la “piña”, nuevo complemento dietético. [revista en Internet]\* 2009 julio. [Acceso 11 de junio del 2018]; 2(1). Disponible en: <http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/tendencias/2009/07/16/186554.php>.
7. Kelly S. Bromelain: A Literature Review and Discussion of its Therapeutic Applications. *Alternative Medicine Review* [revista en internet]\* 1996. [Acceso 02 de junio de 2018]; 1(4): 243-267. Disponible en: <https://www.foundationalmedicinereview.com/wp-content/uploads/2019/02/v1-4-243.pdf>
8. Nadzirah K, Zainal S, Noriham A y Normah I. Efficacy of selected purification techniques for bromelain. *International Food Research Journal* [revista en línea]\* 2013 enero 2012 – mayo 2012. [Acceso 22 de octubre de 2019]; 20(1). Disponible en: <http://www.ifrj.upm.edu.my>.
9. Ketnawa S, Sai-Ut S, Theppakorn T, Chaiwut P, Rawdkuen S. Partitioning of bromelain from pineapple peel (Nang Lae cultv,) by aqueous two phase system. *Asian J Food Agro-Industry* 2009 noviembre – enero. [Acceso 28 de mayo de 2018]; 2(4). Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/238747401>.
10. Wan J, Guo J, Miao Z, Guo X. Reverse micellar extraction of bromelain from pineapple peel – Effect of surfactant structure. *Food Chemistry* [revista en internet]\* 2015 marzo – octubre. [Acceso 25 de octubre del 2016]; 456 (450). Disponible en: [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem).
11. Huerta S. *Precipitación* [CD-ROM], 2a ed, México: editorial Casa Abierta al Tiempo; 2009
12. Burgess R. Protein Precipitation Techniques. *Methods in Enzymology* [revista en internet]\* 2009. [Acceso 20 de noviembre del 2018]; 463(342). Disponible en: DOI: 10.1016/S0076-6879(09)63020-2
13. Layne E. Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins. *Method in Enzymology* [revista en internet]\* 1957. [Acceso 25 de octubre del 2016]; 1154(3): 447-454. Disponible en:

- [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(57\)03413-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(57)03413-8)
14. Enzyme Development Corporation. Gelatin digestion unit analytical method (GDU) Bromelain [en línea], <http://www.enzymedevelopment.com>. Mayo, 2016
  15. Freire G, Holschuh H, Bora P, De Oliveira E. Extraction, bromelain activity and analysis of some chemical parameters in pineapple varieties from Paraíba. *Frutic Jaboticabal* [revista en línea]\* 2009 setiembre 2008 – diciembre 2009. [Acceso 20 de agosto de 2018]; 31(4). Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/rbf/v31n4/v31n4a27.pdf>
  16. Ketnawa S, Chaiwut P and Rawdkuen S. Extraction of bromelain from pineapple peels. *Food science and technology international* [revista en línea]\* 2010 junio 2010 – agosto. [Acceso 21 de agosto de 2018]; 17(4). Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/238747401>
  17. Soares P, Coelho D, Mazzola P, Silveira E, Carneiro M, Pessoa A, et al. Studies on Bromelain Precipitation by Ethanol, Poly (Ethylene Glycol) and Ammonium Sulphate. *Universidade Estadual de Campinas* [revista en línea]\* 2010 noviembre 2009 – junio de 2010. [Acceso 20 de marzo de 2019]; 1(6). Disponible en: [www.elsevier.com/locate/seppur](http://www.elsevier.com/locate/seppur).
  18. Abanto A, Rebaza J. Obtención de la enzima bromelina de los desechos industriales del procesamiento de *Ananas comosus* producidas en el distrito de poroto. [Tesis de grado] Perú: Escuela de Ingeniería química de la Universidad Nacional de Trujillo, 2011.
  19. Rosas C. Contenido de compuestos bioactivos y su contribución a la capacidad antioxidante durante la maduración de “piña” cv. “esmeralda”. [Tesis de maestría] México: Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Tepic 2011.
  20. Vilanova J, Da Silva A, Bonfim A, Curvelo J, Souza N, Ruzene D, et al. Bromelain Enzyme from Pineapple: In Vitro Activity Study under Different Micropropagation Conditions. *Appl Biochem Biotechnol* [revista en línea]\* 2012 febrero 2012 – junio 2012. [Acceso 17 de noviembre de 2018]; 1(13). Disponible en: DOI 10.1007/s12010-012-9753-1
  21. Alvarado E. Evolución de la actividad enzimática de la bromelina presente en el eje de inflorescencia del fruto deshidratado de “piña” (*Ananas comosus* (L.) Merr) [Tesis de Grado]. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala; 2012.
  22. Clavijo D, Portilla M, Quijano A. Cinética y extracción de la bromelina obtenida a partir de la “piña” (*Ananas comosus*) proveniente de Lebrija-Santander. @Limentech [Artículo en internet]\* 2012 octubre-noviembre. [Acceso 29 de abril de 2018]; 10(1). Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/903/90326388008.pdf>.
  23. Soares P, Vaz A, Correia M, Pessoa A, Carneiro-da-Cunha M. Purification of bromelain from pineapple wastes by ethanol precipitation. *Separation and Purification Technology* [Artículo en internet]\* 2012 abril-junio. [Acceso 11 de junio de 2018]; 6(3). Disponible en: [www.elsevier.com/locate/seppur](http://www.elsevier.com/locate/seppur).
  24. Coello D e Hidalgo J. Comparación de la Concentración y Actividad Enzimática de la bromelina obtenida a partir de la pulpa de la “piña” *Ananas comosus* variedad perolera de dos grados de madurez [Tesis de grado]. Guayaquil-Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Litoral; 2013.
  25. Pereira I, Lazzarotto I, Silveira E, Basile E, Gava P. Isolation and Purification of Bromelain from Waste Peel of Pineapple for Therapeutic Application. *Brazilian archives of biology and technology* [revista en línea]\* 2013 noviembre 2013 – diciembre 2013. [Acceso 8 de abril de 2019]; 56(6). Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/babt/v56n6/a12v56n6.pdf>

26. Martins B, Rescolino R, Coelho D, Zanchetta B, Zanchetta B, Tambourgi E, et al. Characterization of Bromelain from *Ananas Comosus* Agroindustrial Residues Purified by Ethanol Fractional Precipitation. *Chemical Engineering Transactions* [Revista en internet]\* 2014. [Acceso 20 de mayo 2018]; 24(2). Disponible en: DOI: 10.3303/CET1437131
27. Babagana K, Bala M. Comparative Study on The Extraction and Purification The Stem and Fruit Bromelain From Pineapple (*Ananas comosus*). *Journal of Natural Sciences Research* [revista en internet]\* 2015. [Acceso 27 de diciembre 2018]; 18(5). Disponible en: www.iiste.org
28. Nor M, Ramchandran L, Duke M, Vasiljevic T. Separation of bromelain from crude pineapple waste mixture by a twostage ceramic ultrafiltration process. *Food and Bioproducts Processing* [Artículo en internet]\* 2016 julio-diciembre. [Acceso 28 de mayo de 2018]; 39(9). Disponible en: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.fbp.2016.01.001>
29. Omotoyimbo O, Sanni D. Characterization of Bromelain from Parts of Three Different Pineapple Varieties in Nigeria. *American Journal of BioScience* [artículo en internet]\* 2017 diciembre-abril. [Acceso 20 de noviembre de 2018]; 5(3):35-41. Disponible en: DOI: 10.11648/j.ajbio.20170503.11
30. Valli N, Kumudha M. Extraction, Purification and Characterization of Bromelain from Pineapple and In Silico Annotation of the Protein. *Helix the scientific explorer* [revista en internet]\* 2017. [Acceso 27 de diciembre 2018]; 7(4). Disponible en; DOI 10.29042/2017-1799-1805.
31. Léchaudela M, Darnaudeyb M, Joëtc T, Fournierd P, Joase J. Genotypic and environmental effects on the level of ascorbic acid, phenolic compounds and related gene expression during pineapple fruit development and ripening. *Plant Physiology and Biochemistry* [artículo en internet]\* 2018 marzo-junio. [Acceso 27 de diciembre de 2018]; 127-138. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.06.041>
32. Iliana C. Panorama mundial de la “piña”. *Pronagro* [internet]\* 2013. [Acceso 11 de mayo de 2018]; 10(4). Disponible en: [pronagro.sag.gob.hn/dmsdocument/3365](http://pronagro.sag.gob.hn/dmsdocument/3365)
33. Dane S. Principales características del cultivo de la “piña” (*Ananas comosus* L.) [en internet] 2016 diciembre. [Acceso 9 de mayo de 2018]; 5(2). Disponible en: <http://fitomejoramientoenpina.blogspot.com.co/2010/10/variedades-de-pina.html>
34. Cáceres E. Manual de “piña”. Proyecto especial Pichis Palcazu [base de datos en internet]. JUNÍN: Perú; 2009 [fecha de acceso 14 de agosto de 2019]. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/144708345/Manual-de-La-Pina>
35. León J. Fundamentos botánicos de los cultivos tropicales. 1ra ed. Lima – Perú, 1968.
36. Quinde F, Sánchez V, Castillo P. Extracción, purificación parcial y secada de la enzima bromelina obtenida a partir del corazón de la “piña” (*Ananas comosus*) [Tesis de grado] Ecuador: servicio de publicaciones e intercambio científico. Escuela Superior Politécnica de Litoral Ecuador; 2013.
37. Álvarez E. Guía técnica de cultivo de “piña”. Centro nacional de tecnología agropecuaria y forestal [base de datos en internet]. CENTA: El Salvador; 2011 [fecha de acceso 20 de mayo de 2018]. Disponible en: <http://www.centa.gob.sv/2015/pina/>
38. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. Extracto crudo de *Ananas comosus* “piña” de todas las variedades. Servicio de Investigación Agrícola [base de datos en internet]. USA; 2019 [fecha de acceso 22 de julio

- de 2019]. Disponible en: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/169124/nutrients>
39. López I, Díaz J, Merino F. La bromelina: una proteasa de interés comercial. *Ciencia y Tecnología Alimentaria, Univ De La Coruña –Francia*. 1996; 1(2): 17-22.
  40. BRENDA [base de datos en internet]\*. Elixir: the comprehensive enzyme information system; 1987-[fecha de acceso 20 de julio de 2019]. Disponible en: [https://www.brenda-enzymes.org/all\\_enzymes.php?ecno=3.4.22.32](https://www.brenda-enzymes.org/all_enzymes.php?ecno=3.4.22.32)
  41. NC-IUBMB [base de datos en internet]\*. Queen Mary: School of Biological and Chemical Sciences; 1992-[fecha de acceso 20 de julio de 2019]. Disponible en: <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/>
  42. Hebbar H, Sumana B, Raghavarao K. Use of reverse micellar systems for the extraction and purification of bromelain from pineapple wastes. *Bioresource Technology [Artículo en internet]\** 2008 abril-octubre 2007. [Acceso 29 de julio de 2018]; 4896(4902). Disponible en: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
  43. Badui D. *Química de los alimentos* 4a. Ed. Editorial Pearson-Educación. México, 2006.
  44. Hernández M, Chávez MA, Báez R, Carvajal C, Márquez M, Morris Humberto, et al. Nueva tecnología para la obtención de un preparado de bromelina de tallo de “piña” (*Ananas comosus*). *Biotechnología Aplicada [revista en internet]\** 2003 abril-agosto. [Acceso 11 de junio del 2018]; 20(3). Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/282252635>.
  45. Kulpreet B, Shilpa T, Amit KS, Madhulika S, Preeti R, Richa S, et al. Bromelain inhibits nuclear factor kappa-B translocation, driving human epidermoid carcinoma A431 and melanoma A375 cells through G2/M arrest to apoptosis. *Molecular carcinogenesis [artículo en internet]\** 2011 agosto – enero. [Acceso 20 de mayo de 2018]; 51(231–243). Disponible en: 10.1002/mc.20769.
  46. Llorente B. *Aislamiento, Purificación, Caracterización y Producción In Vitro de Peptidasas de Alcaucil Coagulantes de la Leche*. [Tesis Doctoral], Argentina: Universidad Nacional de La Plata; 2000
  47. Chakraborty S, Srinivasa P and Niwas H. Modeling the inactivation kinetics of fruit bromelain in pineapple during high-pressure and thermal treatments. *Innovative Food Science and Emerging Technologies [Revista en internet]\** 2015 julio-diciembre. [Acceso 28 de abril de 2018]; 27(4). Disponible en: DOI: 10.1016/j.ifset.2015.12.026.
  48. Xin J. Effect of Surfactant Structure on Reverse Micellar Extraction of Ovalbumin. *Process Biochemistry [Artículo en internet]\** 2014 junio-noviembre. [Acceso 28 de abril de 2018]; 29(5). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.11.013>
  49. Englard S and Seifter S. *Precipitation Techniques. Guide to protein purification. Methods in Enzymology [artículo en internet]\** 1990. [Acceso 25 de setiembre de 2018] 285(22). Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)82024-V](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)82024-V).
  50. Golunski S, Astolfi V, Carniel N, De Oliveira D, Di Luccio M, Mazutti M, et al. Ethanol precipitation and ultrafiltration of inulinases from *Kluyveromyces marxianus*. *Separation and Purification Technology [Artículo en internet]\** 2011 diciembre-febrero. [Acceso 20 de junio de 2019]; 5(1). Disponible en: Doi:10.1016/j.seppur.2011.02.019
  51. Weichselbaum T. An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. *Laboratory Service*



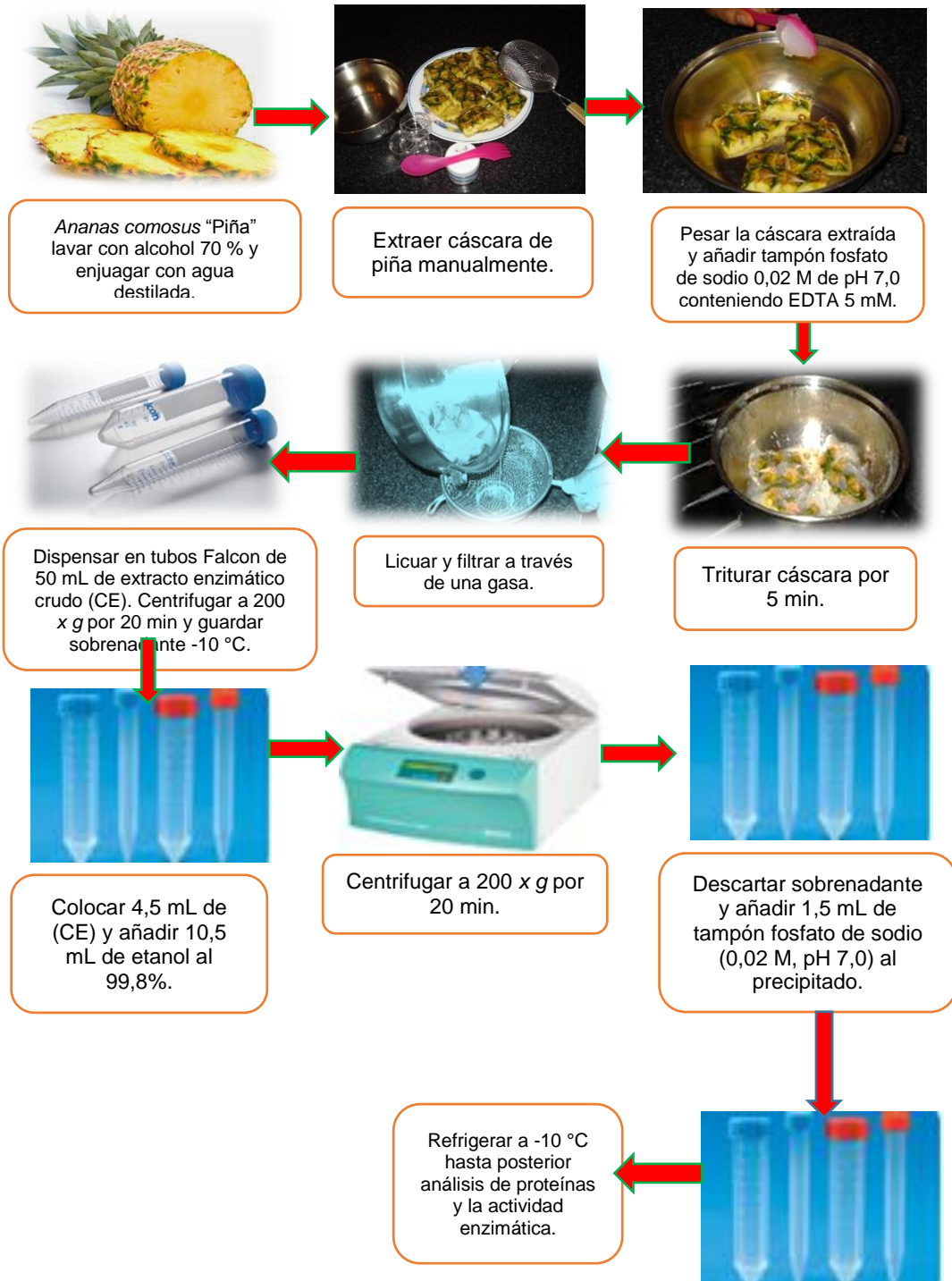
- [revista en internet]\* 1946. [Acceso 24 de octubre del 2018]; 16(3).  
Disponibile en: doi:10.1093/ajcp/16.3\_ts.40
52. 52 Palomino S, Mujica F, García Godos P. Tecnología enzimática. Manual de Laboratorio. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, 2018.



## **ANEXOS**



**Anexo 1.** Extracción de bromelina de *Ananas comosus* “piña” de variedad hawaiana procedentes de Sivia-VRAEM-comercializadas en Mercado de la Asociación de Comerciantes “Nery García Zárate”, Huamanga-Ayacucho 2019.



**Anexo 2.** Determinación de la actividad enzimática de bromelina de *Ananas comosus* “piña” de variedad hawaiana procedentes de Sivia-VRAEM-comercializada en el mercado Nery García Zárate. Huamanga, 2019.

Termostatar los reactivos a 37 °C



dispensar 1 mL de albúmina

+

1 mL de bromelina



Por 60 min a 37 °C



Añadir 2 mL de ATA



Dejar reposar por 5 min



Centrifugar a 18 x g por 3 min

y

descartar el sobrenadante



El precipitado tratar con Biuret modificado por Robinson

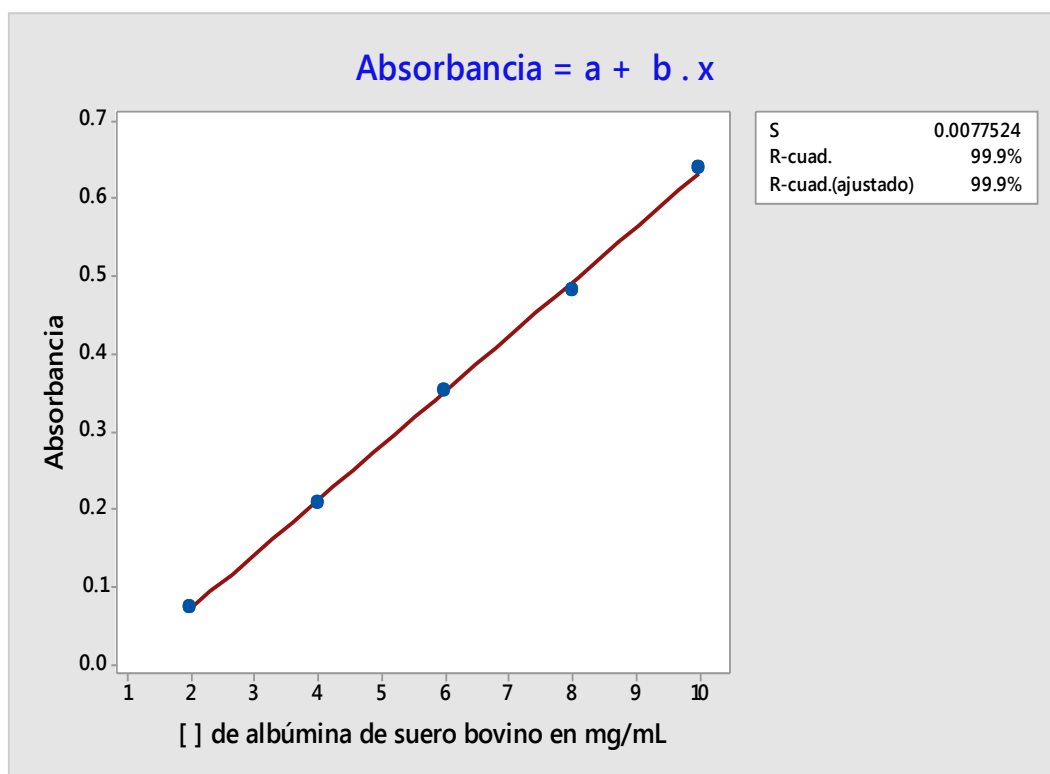


Leer la absorbancia a 554 nm

**Anexo 3.** Calibración de albúmina de suero bovino (BSA) usando el método de biuret modificado por Robinson con el espectrofotómetro a una longitud de onda de 554 nm. Ayacucho, 2019.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia
2	0,075
4	0,209
6	0,352
8	0,482
10	0,640

**Anexo 4.** Gráfica de curva de calibración de albúmina de suero bovino usando el método de biuret modificado por Robinson. Huamanga-Ayacucho, 2019.





**Anexo 5.** Proteínas del extracto crudo de cáscaras de *Ananas comosus* “piña” variedad hawaiana del mercado local Nery García Zárate procedente de Sivia-VRAEM. Ayacucho, 2019.

Grados de madurez	[ ] de proteína del extracto crudo en mg/mL	Promedio mg/mL
IM	2,056	2,15 ± 0,12
	2,056	
	2,094	
	2,288	
	2,274	
M	2,678	2,61 ± 0,32
	2,446	
	2,450	
	2,336	
	3,133	
PM	2,872	2,72 ± 0,30
	2,521	
	2,587	
	3,086	
	2,507	

P<0,05; P=0,008

**Anexo 6.** Concentración de proteína precipitada con etanol de cáscaras de *Ananas comosus* “piña” variedad hawaiana. UNSCH, 2019.

Grados de madurez	[ ] de proteína del extracto crudo en mg/mL	Promedio mg/mL
IM	2,307	2,33 ± 0,10
	2,255	
	2,445	
	2,416	
	2,231	
M	3,105	3,14 ± 0,40
	2,967	
	3,466	
	2,583	
	3,561	
PM	3,637	3,67 ± 0,36
	3,532	
	3,983	
	4,040	
	3,143	

P<0,05; P=0,000

**Anexo 7.** Actividad proteolítica de proteínas precipitadas con etanol de cáscara de *Ananas comosus* “piña”, determinada por proteólisis de albúmina de suero bovino (BSA). UNSCH-Ayacucho, 2019.

Grados de madurez	AP U/mL	Promedio U/mL
IM	6,758	6,51 ± 0,92
	7,343	
	7,212	
	6,143	
	5,091	
M	6,251	5,17 ± 0,72
	5,236	
	4,252	
	5,136	
	4,959	
PM	2,614	2,86 ± 0,43
	3,359	
	3,236	
	2,752	
	2,337	

P<0,05; P=0,000

**Anexo 8.** Actividad específica de bromelina de cáscaras de *Ananas comosus* “piña” de variedad hawaiana. Ayacucho, 2019.

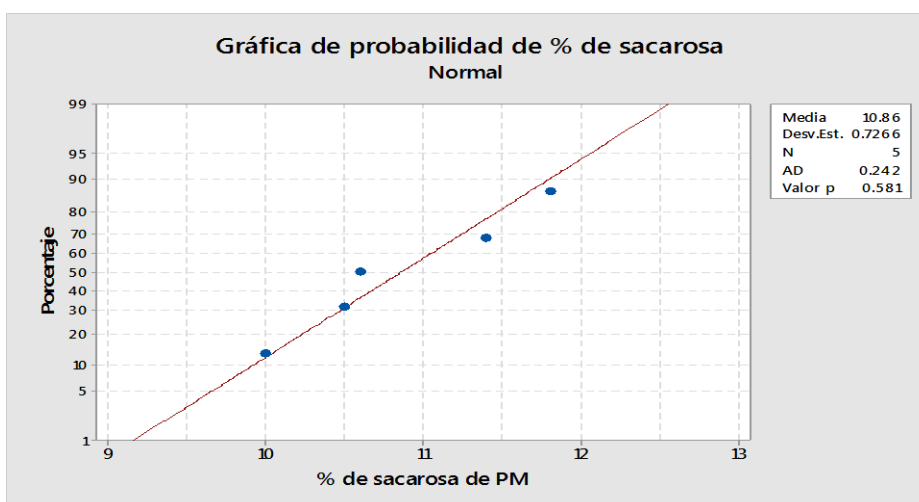
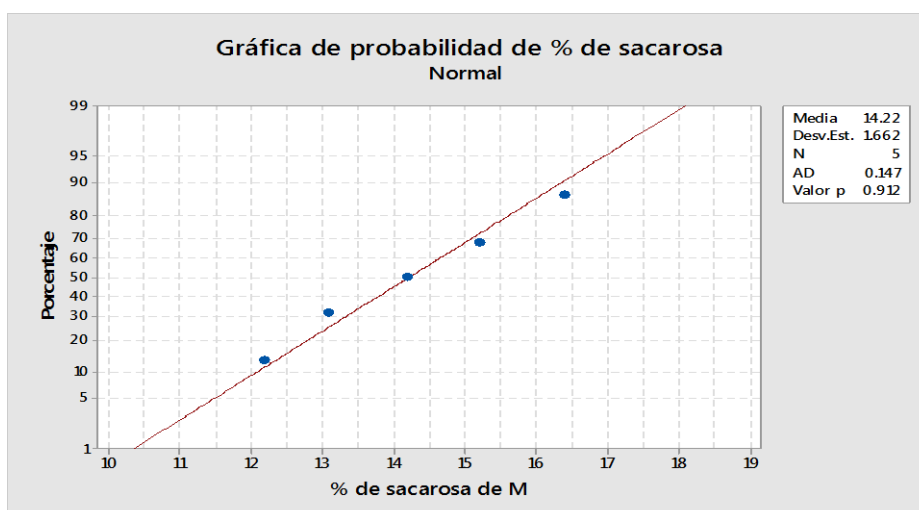
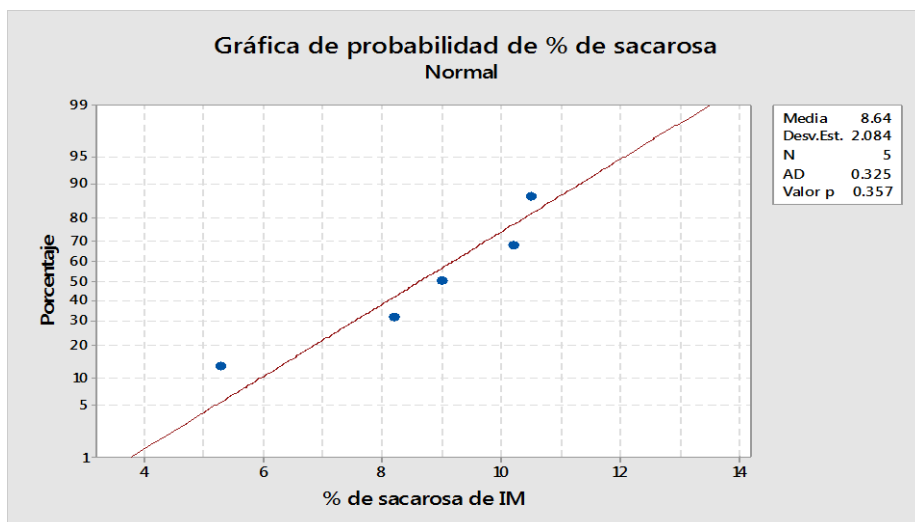
Grados de madurez	AS U/mg	Promedio U/mg
IM	2,929	2,79 ± 0,38
	3,256	
	2,950	
	2,542	
	2,281	
M	2,013	1,68 ± 0,35
	1,765	
	1,227	
	1,989	
	1,393	
PM	0,719	0,78 ± 0,11
	0,951	
	0,813	
	0,681	
	0,744	

P<0,05; P=0,000

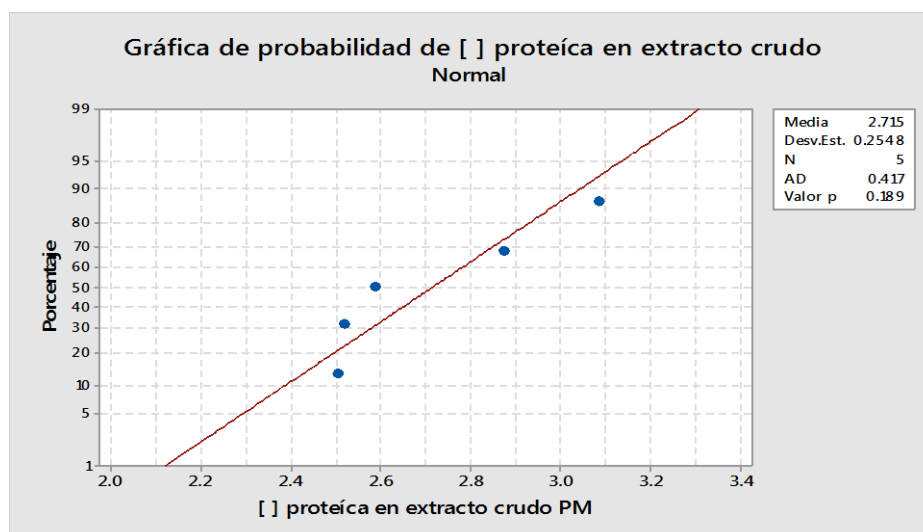
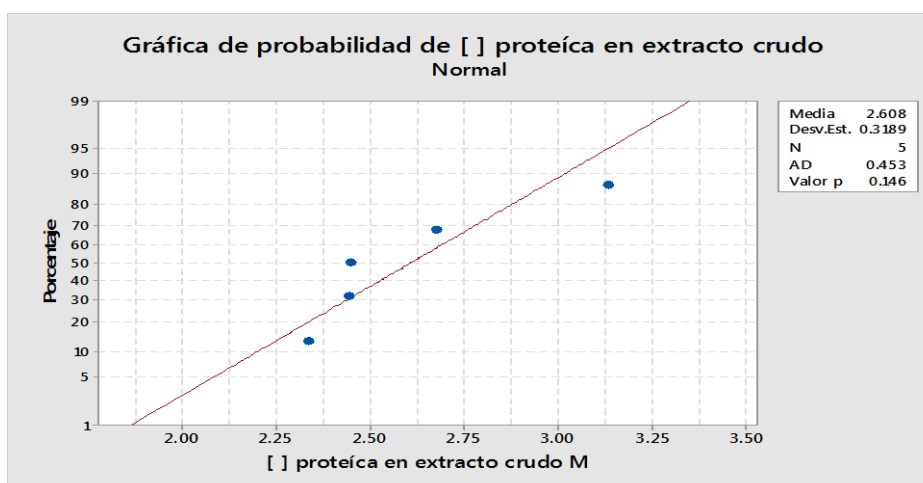
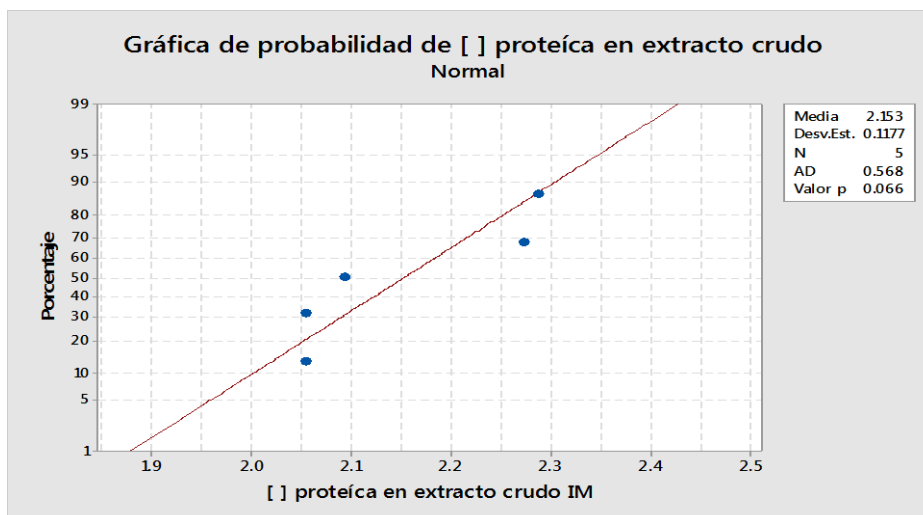
**Anexo 9.** Km y Vmax de bromelina precipitada con etanol de cáscaras de *Ananas comosus* “piña” de variedad hawaiana de Sivia-VRAEM-comercializada en mercado Nery García Zárate de Huamanga-Ayacucho, 2019.

Lineweaver Burk	
1/BSA mg/mL	1/Vo mg/mLxmin <sup>-1</sup>
0.10	281.87
0,07	218,71
0,05	172,91
0,04	138,67
0,03	147,66
0,03	151,13
0,03	151,64

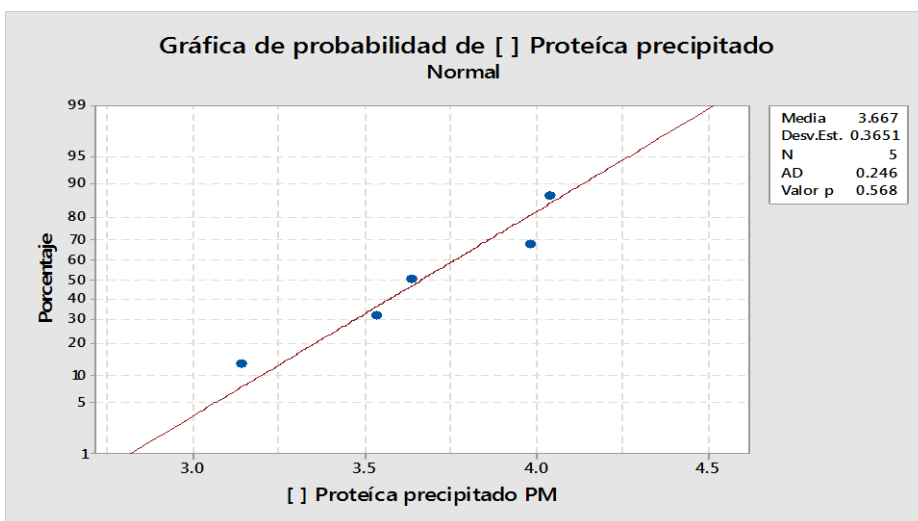
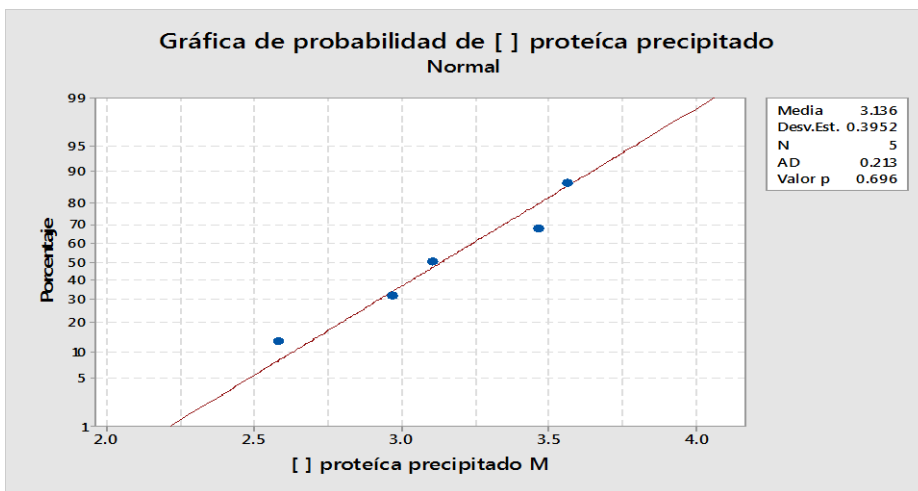
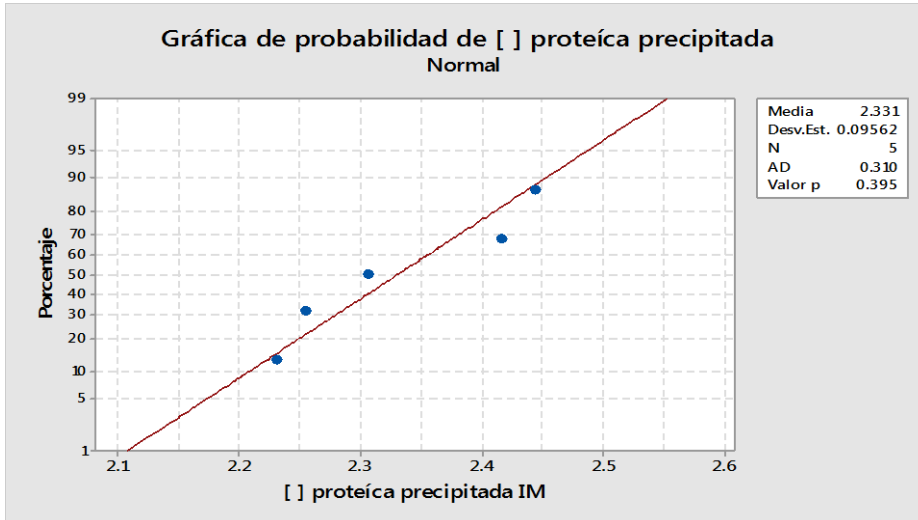
**Anexo 10.** Prueba de normalidad de Anderson - Darling para porcentaje de sacarosa de *Ananas comosus* "piña" de variedad hawaiana procedente de Sivia-VRAEM, determinados mediante programa estadístico Minitab 17. Ayacucho, 2019.



**Anexo 11.** Prueba de normalidad de Anderson - Darling de concentración proteica de extracto crudo de *Ananas comosus* “piña” variedad hawaiana procedente de Sivia-VRAEM-comercializada en el mercado Nery García Zárate. Huamanga-, 2019.

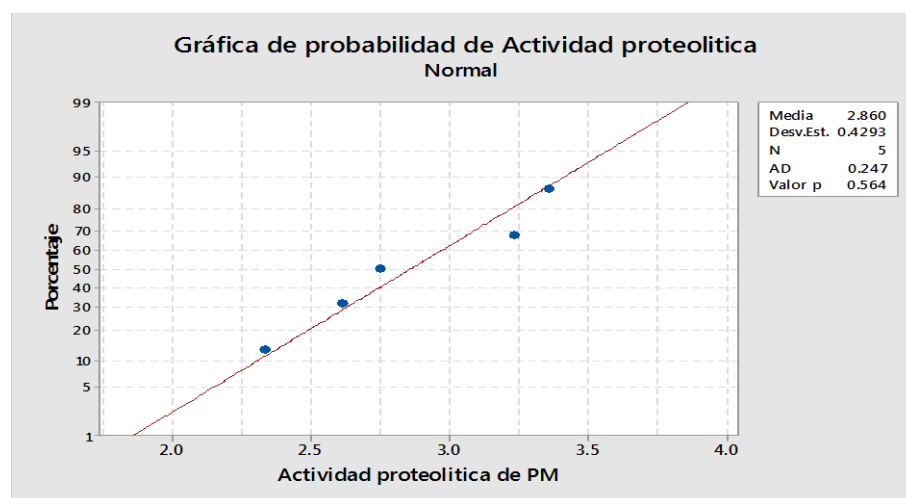
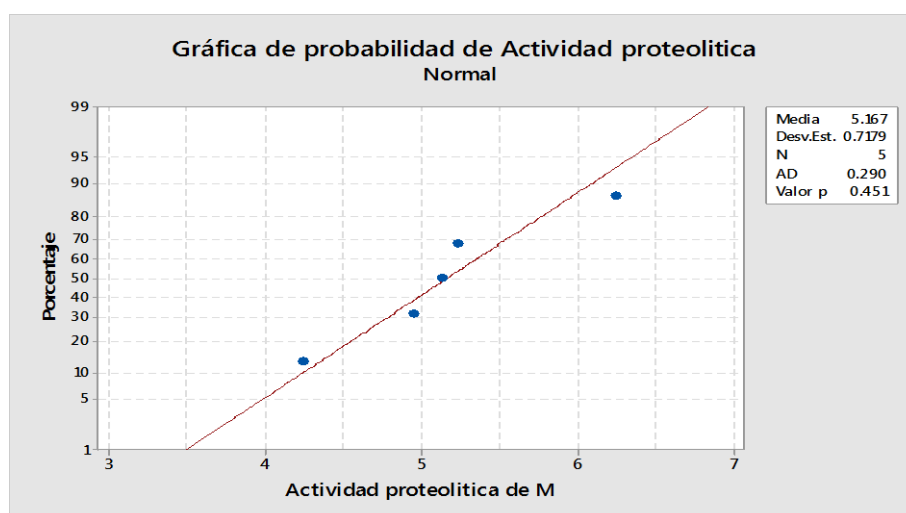
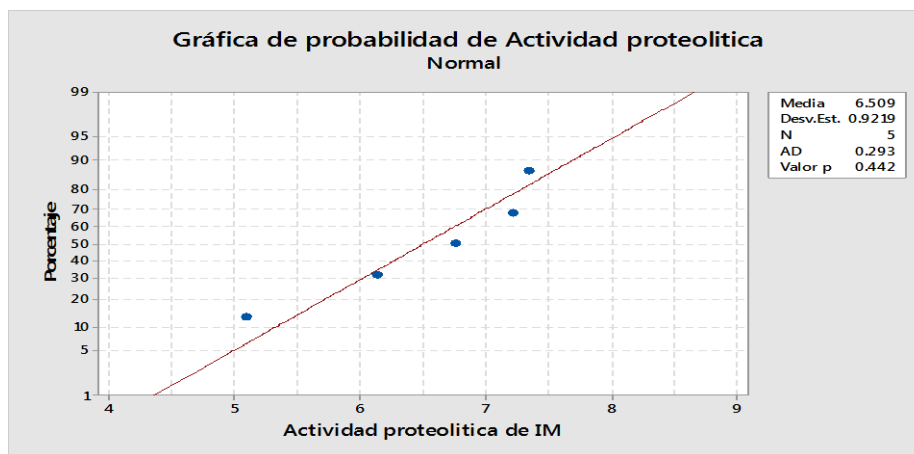


**Anexo 12.** Prueba de normalidad de Anderson – Darling de proteína precipitada con etanol de cáscara de *Ananas comosus* “piña” variedad hawaiana procedente de Sivia-VRAEM-comercializada en el mercado Nery García Zárate. Huamanga, 2019.





**Anexo 13.** Prueba de normalidad de Anderson – Darling de actividad proteolítica de bromelina extraída de cáscara de *Ananas comosus* “piña” variedad hawaiana procedente de Sivia-VRAEM-comercializada en el mercado Nery García Zárate. Ayacucho, 2019.



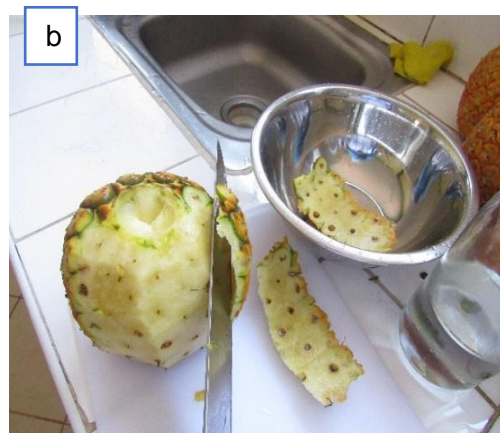
Todos son mayores el p valor es  $> \alpha = 0,05$  y tienden a la normalidad

**Anexo 14.** Comparación en pareja de Tukey con nivel de confianza 95 % de actividad proteolítica de bromelina extraída de cáscara de *Ananas comosus* “piña” variedad hawaiana, procedente de Sivia-VRAEM-comercializada en el mercado Nery García Zárate. Ayacucho, 2019.

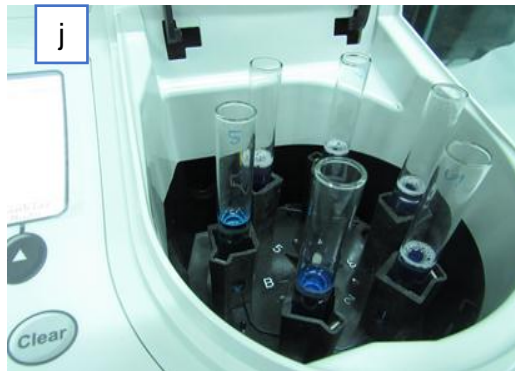
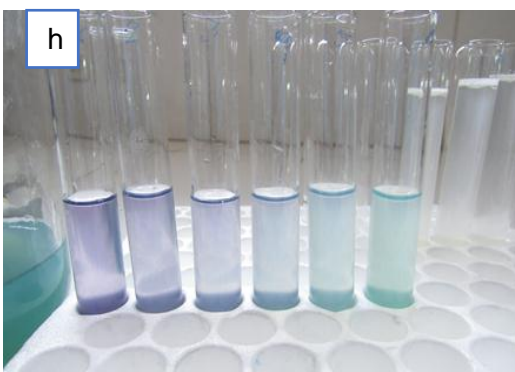
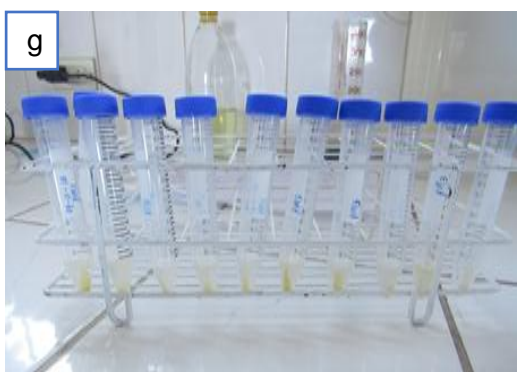
<b>Grado de madurez</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	
<b>IM</b>	5	6,509	A
<b>M</b>	5	5,167	B
<b>PM</b>	5	2,860	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

**Anexo 15.** Separación manual de cáscara del fruto de *Ananas comosus* “piña” de variedad hawaiana. Ayacucho, 2019.



**Anexo 16.** Extracción de bromelina de cáscara de *Ananas comosus* “piña” de variedad hawaiana mediante precipitación con etanol. Ayacucho, 2019.



**Anexo 17.** Bromelina del tallo de *Ananas comosus* “piña” B4882 importado por Merck – Perú de Sigma Aldrich USA. Ayacucho, 2019.



### Anexo 18. Matriz de consistencia

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA
Contenido de bromelina en la cáscara de <i>Ananas comosus</i> “piña” y su relación con la madurez del fruto. Ayacucho, 2019.	¿Cuál será la concentración de bromelina activa obtenida de la cáscara de <i>Ananas comosus</i> “piña” con relación al grado de madurez del fruto?	<p><b>Objetivo general</b></p> <p>Determinar el contenido de bromelina en la cáscara de <i>Ananas comosus</i> “piña” y su relación con la madurez del fruto.</p> <p><b>Objetivos específicos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Caracterizar la piña de acuerdo al grado de madurez mediante análisis físico-químico.</li> <li>• Medir la concentración de proteína en mg/mL del extracto crudo y aislado, precipitado con etanol mediante espectrometría visible.</li> <li>• Evaluar la actividad proteolítica por digestión de albúmina de suero bovino en U/mL.</li> <li>• Calcular actividad específica en U/mg.</li> <li>• Determinar Km y Vmax.</li> </ul>	<p>2.1. Antecedentes</p> <p>2.2. <i>Ananas comosus</i> “piña”</p> <p>2.3. Taxonomía de <i>Ananas comosus</i> “piña”</p> <p>2.4. Composición química de <i>Ananas comosus</i> “piña”</p> <p>2.5. Bromelina</p> <p>2.6. Método de extracción de bromelina</p> <p>2.6.1. Extracción alcohólica</p> <p>2.7. Método de medición de concentración de proteína</p>	La cáscara de <i>Ananas comosus</i> “piña” contiene mayor concentración de bromelina activa en estado posmaduro.	<p><b>Variable independiente</b></p> <p>Cáscaras de frutos de <i>Ananas comosus</i> “piña”.</p> <p><b>Indicadores</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inmaduro</li> <li>• Maduro</li> <li>• Posmaduro</li> </ul> <p><b>Variable dependiente</b></p> <p>Concentración de bromelina activa</p> <p><b>Indicadores</b></p> <p>mg/mL, U/mL y U/mg</p>	<p><b>Investigación</b></p> <p>Básica descriptiva.</p> <p><b>Población.</b></p> <p>“Piñas” provenientes de Sivia-VRAEM seleccionadas como inmadura, madura y posmadura.</p> <p><b>Muestra.</b></p> <p>15 frutos en total. Divididos en 5 “piñas” inmaduras, 5 “piñas” maduras y 5 “piñas” posmaduras.</p> <p><b>Estadístico</b></p> <p>ANOVA</p>