

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



Extracción y caracterización de papaína a partir de residuos de papaya de la industria alimentaria para el aprovechamiento de desperdicios industriales

Trabajo de graduación presentado por Jorge Esteban Martínez Posada para optar al grado académico de Licenciado en Ingeniería Química

Guatemala,

2024

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



Extracción y caracterización de papaína a partir de residuos de papaya de la industria alimentaria para el aprovechamiento de desperdicios industriales

Trabajo de graduación presentado por Jorge Esteban Martínez Posada para optar al grado académico de Licenciado en Ingeniería Química

Guatemala,

2024

Vo. Bo.

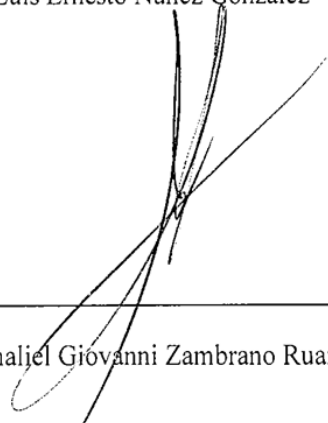
(f) 

Ing. Luis Ernesto Núñez González

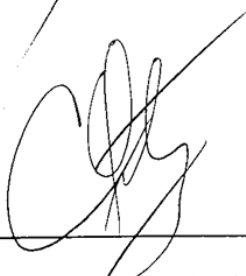
Terna examinadora

(f) 

Ing. Luis Ernesto Núñez González

(f) 

Ing. Gamaljel Giovanni Zambrano Ruano

(f) 

Ing. Carmen Alicia Ortiz Pineda

Fecha de aprobación: Guatemala, 29 de abril de 2024

PREFACIO

El presente trabajo fue escrito con el propósito de dar una idea de cómo reutilizar el desecho de fruta empleada en procesos industriales de fabricación. Se pueden apreciar ciertas deficiencias en el manejo adecuado de residuos y un volumen de productos masivo, por lo que una gran cantidad de alimentos se desechan, sin explorar las ideas del beneficio económico que significaría extraer un sustrato, enzima u otro componente de utilidad para la misma empresa. Al desecharse las mermas de producción sin evaluarse las técnicas de separación, extracción y purificación se generan una gran cantidad de pérdidas económicas, lo que afecta incluso los indicadores del proceso.

Aprovecho el espacio para agradecer a Lic. Aracely de León de laboratorios Serquim S.A. por brindar materiales utilizados durante esta investigación. A Productos alimenticios centroamericanos S.A. por brindar residuos de merma de papaya de su proceso de fabricación, y finalmente al Ing. Luis Núñez, quien me brindó asesoramiento y apoyó facilitando el uso de laboratorios y equipos de la Universidad del Valle de Guatemala para que esta investigación pudiera ser concretada.

Contenido

Prefacio	I
Contenido.....	II
Lista de cuadros	IV
Lista de figuras.....	VIII
Resumen.....	X
Abstract.....	IX
Introducción	1
Objetivos	3
Objetivo general.....	3
Objetivos específicos	3
Justificación	4
Marco teórico.....	5
Fuentes de papaína.....	5
Papaína.....	6
Mecanismo de acción	7
Extracción de papaína.....	8
Purificación de papaína.....	10
Liofilización y secado al vacío	13
Cuantificación de la actividad enzimática	17
Aplicaciones industriales	21
Antecedentes	25
Metodología.....	28
Resultados	35
Discusión de resultados	40
Conclusiones	51
Recomendaciones	52

Referencias.....	54
Anexos	58
Datos originales	58
Cálculos de muestra	66
Datos calculados	70
Análisis de error.....	83
Especificaciones técnicas de equipos	85
Registro gráfico de experimentación	91
Glosario.....	99

Lista de cuadros

Cuadro 1. Actividad enzimática fuentes de papaína	35
Cuadro 2. Prueba T para determinación de diferencia de medias	35
Cuadro 3. Prueba post hoc Tukey para precipitados	35
Cuadro 4. Prueba post hoc Tukey para crudos	36
Cuadro 5. Comparativo de actividad enzimática crudos contra pastillas	36
Cuadro 6. Comparativo de actividad enzimática precipitados contra pastillas	36
Cuadro 7. Pesos de muestra papaína precipitada para soluciones	59
Cuadro 8. Pesos de muestra cruda para soluciones	60
Cuadro 9. Pesos de muestra papaína precipitada para soluciones	60
Cuadro 10. Pesos de tabletas papaína (producto comercial concentración 100,000 U USP/tableta para solución madre)	61
Cuadro 11. Peso promedio tomado (tableta macerada para solución madre de STD) ...	61
Cuadro 12. Peso de tubos centrífuga para precipitado de fruto de papaya	61
Cuadro 13. Peso de tubos centrífuga para precipitado de cáscara de papaya	62
Cuadro 14. Peso de tubos centrífuga para precipitado de semillas de papaya	62
Cuadro 15. Absorbancias de solución 0.515 g/100 mL (fruto crudo liofilizado)	62
Cuadro 16. Absorbancias de solución 0.537 g/100 mL (cáscara cruda liofilizada)	63
Cuadro 17. Absorbancias de solución 0.521 g/100 mL (pasta de semillas cruda liofilizada)	63
Cuadro 18. Absorbancias de solución 0.149 g/100 mL (papaína precipitada extracto de fruto liofilizada)	63
Cuadro 19. Absorbancias de solución 0.149 g/100 mL (papaína precipitada extracto de cáscara liofilizada)	64

Cuadro 20. Absorbancias de solución 0.149 g/100 mL (papaína precipitada extracto de semillas liofilizada).....	64
Cuadro 21. Absorbancias de solución blanco	64
Cuadro 22. Absorbancias (curva de calibración Papaína producto comercial concentración 100,000 U USP/Tableta).....	65
Cuadro 23. Absorbancia real curva de calibración papaína producto comercial 360,000 USP/Tableta	70
Cuadro 24. Absorbancia real de cáscara cruda liofilizada.....	71
Cuadro 25. Absorbancia real de semilla cruda liofilizada	71
Cuadro 26. Absorbancia real de fruta cruda liofilizada	71
Cuadro 27. Absorbancia real de precipitado extracto de cáscara liofilizado	71
Cuadro 28. Absorbancia real de precipitado extracto de semilla liofilizada	72
Cuadro 29. Absorbancia real de extracto de Fruta liofilizada	72
Cuadro 30. Unidades USP/mL curva de calibración producto comercial	73
Cuadro 31. Unidades USP/mL (fruto crudo liofilizado).....	73
Cuadro 32. Unidades USP/mL (cáscara cruda liofilizada)	73
Cuadro 33. Unidades USP/mL (pasta de semillas cruda liofilizada).....	74
Cuadro 34. Unidades USP/mL (papaína precipitada extracto de fruto liofilizado).....	74
Cuadro 35. Unidades USP/mL (papaína precipitada extracto de cáscara liofilizado)	74
Cuadro 36. Unidades USP/mL (papaína precipitada extracto de semillas liofilizado)	74
Cuadro 37. Unidades USP/g (fruto crudo liofilizado)	75
Cuadro 38. Unidades USP/g (cáscara cruda liofilizada).....	75
Cuadro 39. Unidades USP/g (pasta de semillas cruda liofilizada)	75
Cuadro 40. Unidades USP/g (papaína precipitada extracto de fruto liofilizado)	75

Cuadro 41. Unidades USP/g (papaína precipitada extracto de cáscara liofilizado)	76
Cuadro 42. Unidades USP/g (papaína precipitada extracto de semillas liofilizado)	76
Cuadro 43. Comparativo de actividad enzimática de cáscara cruda contra STD pastilla	76
Cuadro 44. Comparativo de actividad enzimática de semilla cruda contra STD pastilla	76
Cuadro 45. Comparativo de actividad enzimática de fruta cruda contra STD pastilla....	77
Cuadro 46. Comparativo de actividad enzimática de cáscara precipitada contra STD pastilla.....	77
Cuadro 47. Comparativo de actividad enzimática de semilla precipitada contra STD pastilla.....	77
Cuadro 48. Comparativo de actividad enzimática de fruta precipitada contra STD pastilla	78
Cuadro 49. Diferencia de comparativo entre precipitado de extracto de cáscara contra cáscara cruda.....	78
Cuadro 50. Diferencia de comparativo entre precipitado de extracto de semilla contra semilla cruda	78
Cuadro 51. Diferencia de comparativo entre precipitado de extracto de fruta contra fruta cruda.....	79
Cuadro 52. Pérdida de humedad por secado para crudos	79
Cuadro 53. Pérdida de humedad por secado para precipitados	80
Cuadro 54. Pesos de precipitado y extracto	80
Cuadro 55. Balance de energía del secador al vacío precipitado de semillas.....	80
Cuadro 56. Balance de energía de bomba de vacío secador precipitado de semillas	81
Cuadro 57. Balance de energía de secador al vacío semillas crudas	81
Cuadro 58. Balance de energía bomba de vacío semillas crudas	81
Cuadro 59. Balance de energía de secador precipitado de fruta	81
Cuadro 60. Balance de energía de bomba de vacío precipitado de fruta.....	81

Cuadro 61. Balance de energía de secador de fruta cruda	82
Cuadro 62. Balance de energía de bomba de vacío de fruta cruda	82
Cuadro 63. Balance de energía de secador precipitado de cáscara.....	82
Cuadro 64. Balance de energía de bomba de vacío precipitado de cáscara.....	82
Cuadro 65. Balance de energía de secador de cáscara cruda.....	83
Cuadro 66. Balance de energía de bomba de vacío cáscara cruda.....	83
Cuadro 67. Especificaciones técnicas del espectrofotómetro shimadzu UV mini 1240 .	85
Cuadro 68. Especificaciones técnicas de la Balanza humedad Ohaus MB45	86
Cuadro 69. Especificaciones técnicas de la Balanza Ohaus Pioneer PX163E	87
Cuadro 70. Especificaciones técnicas del Liofilizador Labconco Freezone 4.5	88
Cuadro 71. Especificaciones técnicas del Eppendorf 5804 R	89
Cuadro 72. Especificaciones técnicas del Fischer scientific Centrifig Model 228	90

Lista de figuras

Figura 1. Carica papaya. (Imagen ilustrativa).....	5
Figura 2. Estructura tridimensional de la papaína	6
Figura 3. Mecanismo catalítico de proteasas	8
Figura 4. Diseño de extracción de papaína	9
Figura 5. Cromatograma de intercambio iónico de papaína	11
Figura 6. Precipitación de enzimas por adición de sales de amonio	13
Figura 7. Esquema general de equipos de liofilización	16
Figura 8. Coloración del reactivo de Folin-Ciocalteu	20
Figura 9. Estructura molecular de heparina sintetizada por enzimas	22
Figura 10. Aminoácidos libres en mosto de cerveza con papaína	23
Figura 11. Balance de masa teórico para procesamiento de papaya industrial	27
Figura 12. Balance de masa y energía propuesta para el proceso de extracción enzimática semillas de papaya	37
Figura 13. Balance de masa y energía propuesta para el proceso de extracción enzimática fruta de papaya	38
Figura 14. Balance de masa y energía propuesta para el proceso de extracción enzimática cáscara de papaya	39
Figura 15. Curva de calibración de papaína (producto comercial concentración 360,000 U USP/Tableta)	72
Figura 16. Espectrofotómetro Shimadzu UV mini 1240	85
Figura 17. Balanza Ohaus MB45.....	86
Figura 18. Balanza Ohaus Pioneer PX163E	87
Figura 19. Liofilizador Labconco Freezone 4.5	88
Figura 20. Equipo para centrifugación de muestras precipitadas	89

Figura 21. Equipo para centrifugación de muestras precipitadas 2	90
Figura 22. Cáscara de papaya antes de liofilización	92
Figura 23. Condiciones de liofilización.....	92
Figura 24. Muestras de cáscara de papaya húmeda antes de la determinación de humedad	93
Figura 25. Balanza de humedad, determinación de humedad de fruta cruda liofilizada	93
Figura 26. Muestra de cáscara de papaya liofilizada	94
Figura 27. Precipitado centrifugado de semillas de papaya	94
Figura 28. Precipitado centrifugado de fruto de papaya	95
Figura 29. Precipitado de cáscara de papaya liofilizado	95
Figura 30. Pastillas de papaína trituradas usado como estándar	96
Figura 31. Sustrato de caseína preparado para actividad enzimática	96
Figura 32. Soluciones de cáscara (fondo izquierdo), fruto, semillas y solución madre de pastillas de papaína	97
Figura 33. Soluciones de semillas y fruto liofilizado	97
Figura 34. Medición de actividad enzimática, antes de la adición de ácido tricloroacético	98
Figura 35. Precipitado de caseína, medición de actividad enzimática, post adición ácido tricloroacético	98
Figura 36. Solución filtrada medición de actividad enzimática precipitado de semillas de papaya	99
Figura 37. Medición de absorbancias de actividad enzimática en espectrofotómetro	99

Resumen

Este trabajo de graduación se enfocó en determinar la mejor fuente de extracción de papaína, (cáscara, fruto o semillas) a partir de una merma de producción industrial. Se determinó que la actividad enzimática de la papaína obtenida por las muestras crudas de cáscara, fruta y semillas fue de $11,404.377 \pm 418.480$, $45,999.284 \pm 1944.804$ y 91348.019 ± 1472.609 unidades USP por gramo de material, respectivamente, al compararse contra un producto comercial de papaína, se obtuvo una extracción de unidades USP de 2.107%, 8.497 y 16.874% (m/m), respectivamente. Mientras que la actividad enzimática de la papaína obtenida por las muestras precipitadas de cáscara, fruta y semillas fueron de $264,129.317 \pm 2671.277$, $257,410.087 \pm 2788.887$ y $280,860.202 \pm 3386.887$ unidades USP por gramo de material, respectivamente; al compararse contra un producto comercial de papaína, se obtuvo una extracción de unidades USP de 48.791%, 47.653% y 51.881% (m/m) respectivamente. Por medio de un análisis post hoc Tukey, con un nivel de significancia del 95%, se determinó que existen diferencias significativas entre las muestras crudas y precipitadas de fruta y cáscara, cáscara y semilla, y semilla y cáscara siendo la muestra de semillas significativamente mayor que las otras. Además, se determinó, con un 95% de confiabilidad, que existen diferencias significativas entre la media de la actividad enzimática de las tres muestras precipitadas contra las muestras crudas; por lo tanto, para obtener una actividad enzimática por gramo mayor se debe realizar una precipitación utilizando el extracto de las materias primas.

Palabras Clave: Papaína, enzimas, actividad enzimática, liofilización, extracto, residuos, papaya.

Abstract

This graduation project evaluated the extraction of papain from industrial papaya by-products (peel, fruit, and seeds) to identify the most efficient source. The enzymatic activity obtained from crude samples was $11,404.38 \pm 418.48$, $45,999.28 \pm 1944.80$, and $91,348.02 \pm 1472.61$ USP units/g for peel, fruit, and seeds, respectively, representing 2.11%, 8.50%, and 16.87% (w/w) compared to a commercial product. In precipitated samples, enzymatic activity reached $264,129.32 \pm 2671.28$, $257,410.09 \pm 2788.89$, and $280,860.20 \pm 3386.89$ USP units/g, equivalent to 48.79%, 47.65%, and 51.88% (w/w), respectively. Statistical analysis (Tukey, $p < 0.05$) revealed significant differences between seeds and the other samples, with seeds showing the highest enzymatic activity. Significant differences were also found between crude and precipitated extracts, indicating that precipitation substantially increases enzymatic activity per gram. These findings highlight papaya seeds as the most promising source of papain from industrial residues.

Keywords: Papain, enzymes, enzymatic activity, lyophilization, extract, residues, papaya.

I. Introducción

En la industria agroalimentaria, la generación de residuos es un desafío constante que plantea problemas ambientales y económicos. La carga papaya es una fuente significativa de desechos durante su procesamiento industrial en la industria de alimentos, cosméticos y farmacéuticos. Los residuos de cáscaras, semillas y pulpa no apta para el consumo humano representan una carga para las operaciones de las plantas de procesamiento y plantean un problema de eliminación adecuada, ya que sin el debido tratamiento, son utilizadas como abono en el sector agroindustrial; sin embargo, la papaya contiene una enzima proteolítica de interés comercial, la papaína, la cual ha demostrado tener diversas aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética debido a sus propiedades proteolíticas y bioactivas. La papaína ha despertado un gran interés debido a su capacidad para degradar proteínas, su actividad antiinflamatoria y su potencial para la mejora de procesos industriales (Díaz, 2019). En este contexto, la extracción de papaína a partir de los residuos de la papaya surge como una estrategia para la valorización de los desechos de la industria alimentaria y la obtención de un producto de alto valor añadido. Se estima que Guatemala se encuentra en el 10° lugar en producción de papaya a nivel mundial con 206,500 T (FAO, 2014), Esta línea de investigación busca aprovechar las propiedades enzimáticas de la papaína, transformando los residuos de la papaya en una fuente rentable y sostenible de esta enzima (Tovar, 2010). La extracción de papaína de los residuos de la papaya implica la implementación de técnicas y procesos de extracción eficientes y rentables, así como la optimización de las condiciones de extracción para garantizar la máxima actividad enzimática y rendimiento. Además, se requiere una etapa de purificación para obtener una papaína de alta calidad y pureza, lista para su uso en diversas aplicaciones industriales (Tovar, 2010).

La extracción de papaína es un proceso por el cual se aísla la enzima y se mantiene su actividad. Por lo que se requiere de escoger la mayor fuente de papaína para llevarse a cabo, en la mayoría de los casos es el látex o leche de papaya. A partir de este, se inicia un proceso en el que primero se eliminan todos los interferentes e impurezas de la papaya, material ceroso y compuestos orgánicos. Una vez eliminadas las impurezas se procede al secado del látex o fruto mediante un equipo de vacío que pueda retirar la humedad sin oxidar las muestras o disminuir la actividad enzimática (Rodríguez, 1995). La purificación de la

papaína consiste en la precipitación de la enzima por medio del punto isoelectrico, por incremento de fuerza iónica o bien por la adición de solventes que disminuyan la solubilidad de la papaína, lo que permite eliminar impurezas no precipitables, que pueden ser eliminadas por medio de una filtración. Sin embargo, dado a que existen interferentes que también precipitan, como otras proteínas presentes, para alcanzar una pureza superior, se recomienda la separación de estas por una cromatografía específica para retener impurezas dependiendo de las interacciones de las cargas de las proteínas mediante un efecto de interacciones de Van Der Waals y Coulomb (Roe, 2001).

II. Objetivos

2.1. General

Extraer y cuantificar papaína extraída de los residuos de producción industrial de papaya y comparar la actividad enzimática de la cáscara, semillas y fruto para determinar la mejor fuente de extracción.

2.2. Específicos

- Comparar la actividad enzimática obtenida de tres masas iguales de fuentes de papaína, cáscara, semillas y fruto de papaya sin madurar, para determinar la mejor fuente de extracción de papaína.
- Purificar y separar la enzima obtenida por medio del método de precipitación alcohólica, centrifugación y filtración, para determinar la eficiencia de la enzima purificada comparándola contra la enzima sin purificar.
- Comparar la actividad enzimática de las tres fuentes de papaína contra un producto comercial de actividad conocida, para tener un punto de comparación de la cantidad de papaína extraída en muestras precipitadas y crudas.

III. Justificación

La papaya (*Carica papaya*) en la producción alimentaria en Guatemala genera grandes cantidades de residuos, los cuales representan un problema ambiental y un desperdicio de recursos con un potencial aprovechamiento; sin embargo, la papaína contenida en esta tiene múltiples aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética debido a sus propiedades proteolíticas, antiinflamatorias y degradantes. A nivel mundial, el principal exportador de papaya es México, con una participación del 1% mundial, aproximadamente 0.37 MT durante el año 2022, siendo el principal destino Estados Unidos ya sea para la fabricación de productos en base a esta fruta, extracción enzimática o para consumo de la fruta. La extracción de papaína a nivel mundial cuenta con una participación de 150 millones de dólares anuales en la industria farmacéutica, cosmética y de alimentos, con una producción de 900 a 1000 toneladas métricas hasta el 2005. De los cuales solamente 10% aproximadamente es refinado y purificado, la importancia de la extracción de papaína radica en que, no se ha encontrado o desarrollado una enzima sintética con las mismas propiedades, y que sea más barata de producir que la papaína, dado a la alta producción de papaya a nivel mundial (Fernández. 2005).

A nivel nacional, el mercado de papaya representa el 0.63% de la participación mundial, en el 2021, con un volumen de producción de 88.62 millones de kg y siendo el tercer producto más exportado de la región con un 8.14% de participación a nivel nacional (Tridge, 2022). Sin embargo, no se encontraron datos acerca del nivel de producción de enzimas de papaína a nivel nacional, ni el porcentaje de participación de exportaciones que esto tiene a nivel mundial, lo cual indica que la utilización de residuos o de materia prima para la producción de papaína a nivel industrial es casi nula. El presente trabajo se abordó con la finalidad de evaluar la utilidad de la merma del proceso de producción, para la extracción y secado de papaína, así como determinar la actividad enzimática tanto del producto crudo como del producto precipitado a nivel de laboratorio. La necesidad de la evaluación surge, debido a que en el transporte, lavado y tratamiento previo de la materia prima se pierde entre un 15% a un 25% de materia prima por acumulación en los equipos, desperdicio inocuo por caer al suelo o en mal estado para el consumo humano según datos de la misma empresa. Cada tanda realizada consta aproximadamente de 5,000 kg de papaya de la cual la merma es desechada por completo sin la previa evaluación de la utilidad como fuente de papaína. El problema de la merma no solo repercute a nivel de proceso y logístico, dado a que se utiliza espacio para almacenarla, y posteriormente desecharla, sino también repercute en el factor económico, ya que al utilizar una cantidad de materias primas mayor en la entrada del proceso que la obtenida al final de este, ya sea por pérdidas o acumulación, disminuye los rendimientos de producción, aumentando los costos de fabricación. Por esta razón, se plantea el siguiente trabajo como una evaluación técnica a nivel de laboratorio de la utilidad de la merma de papaya como fuente de papaína, que permita extraer y utilizar la papaína presente, y aplicarse en diversos procesos adicionales más adelante.

IV. Marco teórico

4.1. Fuentes de papaína

La principal fuente de papaína, del cual deriva el nombre de la enzima, es la *Carica papaya* esta es una fruta tropical ampliamente cultivada en diversas regiones del mundo debido a su valor nutricional, según estimaciones de la FAO, en 2014, Guatemala ocupaba el lugar No. 10 a nivel mundial en el cultivo y producción de papaya, con un aproximado de producción de 206,500 T (MAGA, 2014).

Figura 1.

Carica Papaya.



Nota. Imagen ilustrativa tipos teratológicos del fruto Adaptada de autor Jiménez (2002)

La *Carica papaya* posee una facilidad de arraigamiento, puesto que es bastante superficial para tener un buen desarrollo radicular. Generalmente las plantaciones de papaya requieren de relativamente poca distancia entre cada árbol, siendo recomendado entre 2.5 y 3 m entre cada tronco, en condiciones ideales el tiempo de germinación tiende a ser entre dos a tres semanas; no obstante, dependerá de las condiciones del suelo, ya que pueden llegar a tardar entre tres y cinco semanas. La fertilización del árbol demanda altas cantidades de nutrientes, principalmente nitrógeno. No será necesaria la suplementación con fertilizantes inorgánicos, si estos son plantados en un área con condiciones esenciales de nutrientes y un pH entre 6 a

6.5, así como en condiciones de humedad y temperatura ideales; zonas de pluviometría media de 1,800 mm anuales y temperatura templada entre 20 a 22°C.

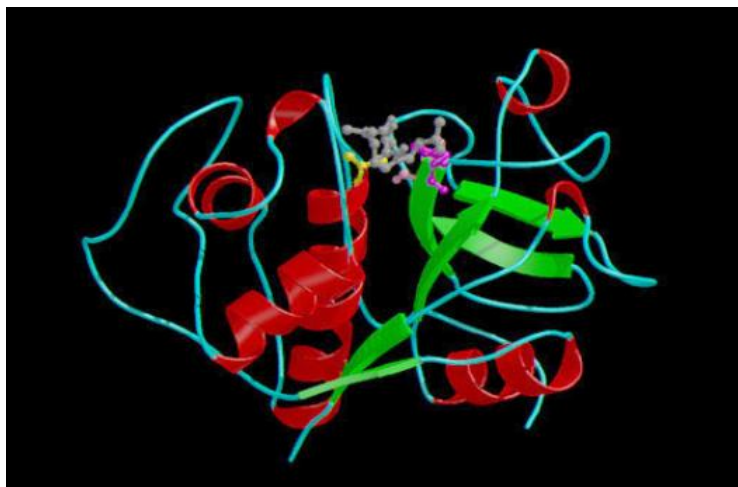
En la industria alimentaria, la papaya sin madurar, o papaya verde es ampliamente utilizada para la elaboración de salsa dulce, ya que a pesar de que tradicionalmente, esta se ha producido a partir de ingredientes como tomates, azúcar, vinagre y especias, existe una creciente tendencia hacia la innovación culinaria y la exploración de nuevos sabores y combinaciones de ingredientes. En este concepto, con la finalidad de ahorrar costos en un país altamente productor, la papaya emerge como una opción interesante en la producción de salsa dulce debido a su sabor único, precio y su facilidad de logística para su producción en Guatemala (Ramirez, 2019). Dentro de este contexto, la producción de papaya a nivel nacional ha aumentado considerablemente, las condiciones de la región propician un buen crecimiento y cultivo del fruto, en áreas como Petén de alta humedad y condiciones de temperatura óptima, ANISA, empresa papayera de Guatemala, cuenta con extensiones mayores a 500 ha para el cultivo de papaya en Las Cruces, Petén.

4.2. Papaína

La papaína está compuesta por 212 aminoácidos, 3 grupos disulfuro y un grupo funcional libre. Esta es una enzima proteolítica identificada como EC 3.4.22.2 por la comisión enzimática. Esta corresponde al grupo de enzimas hidrolasas la cual se realiza sobre enlaces peptídicos. La papaína posee la particularidad de poder romper enlaces peptídicos sin que estos se destruyan o se genere una racemización de productos. Su estructura tridimensional ha sido ampliamente estudiada, a nivel molecular esta es una enzima globular, es decir, su forma tridimensional es compacta y esférica, compacta y plegada, la cual le confiere su actividad proteolítica (Rawlings. 2018).

Figura 2.

Estructura tridimensional de papaína



Nota. Adaptada de Rawlings. (2018)

La estructura de la papaína se divide en varios dominios y regiones funcionales; el dominio catalítico, el cual es la región central de la enzima y responsable de su actividad proteolítica. Contiene el sitio activo donde se produce la interacción con los sustratos proteicos. El sitio activo de la papaína contiene residuos de aminoácidos, como la cisteína, que juegan un papel crucial en la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas; el dominio de unión al sustrato, este se encuentra en la región cercana al sitio activo y está involucrado en la interacción con los sustratos proteicos. Facilita el reconocimiento y unión específica de las proteínas que serán degradadas por la papaína; y finalmente las estructuras secundarias, como hélices alfa y láminas beta, que contribuyen a su estabilidad y función. Estas estructuras secundarias se organizan en diferentes formas y plegamientos que dan forma y soporte a la estructura global de la enzima (Tineo, 2020).

4.3. Mecanismo de acción

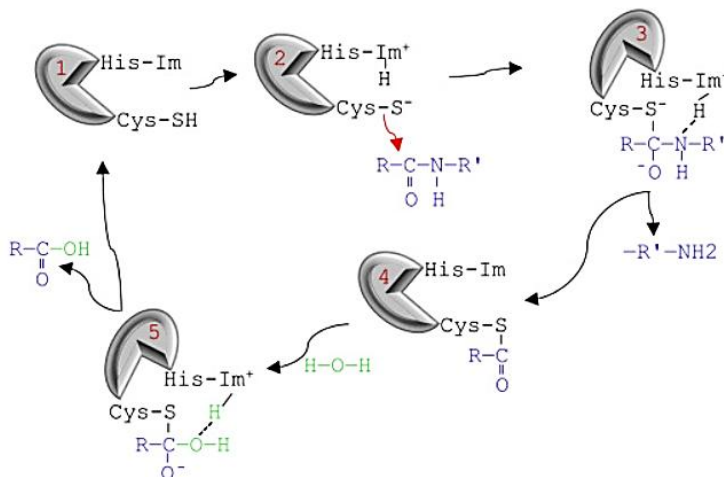
La papaína es una enzima proteolítica que actúa como una cisteína proteasa. Su mecanismo de acción implica la hidrólisis de los enlaces peptídicos en las proteínas, lo que conduce a la degradación de estas en fragmentos más pequeños, básicamente, esta actúa sobre los enlaces peptídicos de las proteínas, hidrolizándolos y descomponiéndolos en péptidos y aminoácidos más pequeños. La papaína es

altamente específica para los enlaces peptídicos en los que el residuo de aminoácido siguiente es una cisteína o una glicina (Lin, 2020).

El mecanismo de acción de la papaína consta de varios pasos; esta iniciará por la activación, en donde la papaína se activa mediante la formación de un enlace tioéster con su residuo de cisteína activo. Esto ocurre cuando un nucleófilo, típicamente la cisteína del sitio activo de la papaína ataca el carbono carbonílico del enlace peptídico objetivo. Este proceso forma un intermediario covalente conocido como estado de transición tetraédrico que generalmente no suele durar mucho tiempo; después de esto, ocurre un ataque nucleofílico, en este la papaína utiliza su nucleófilo activo para atacar el carbono carbonílico del enlace peptídico a romper. Esto provoca la ruptura del enlace y la formación de una nueva estructura intermedia llamada estado de transición acilo; seguido la papaína pasa al estado de protonación, en el cual, cómo su nombre lo indica, se produce la protonación del grupo saliente, que es el fragmento de la proteína dividida. Esto facilita la eliminación del grupo saliente y la finalización de la reacción de hidrólisis, para finalmente pasar a la liberación del producto, en la que, tras la ruptura del enlace peptídico, se liberan los productos de la reacción: los fragmentos de proteína dividida y la papaína regenerada y lista para llevar a cabo nuevas reacciones (Lin, 2020)

Figura 3.

Mecanismo catalítico de proteasas de cisteína: Activación, ataque nucleofílico, protonación, Liberación de producto.



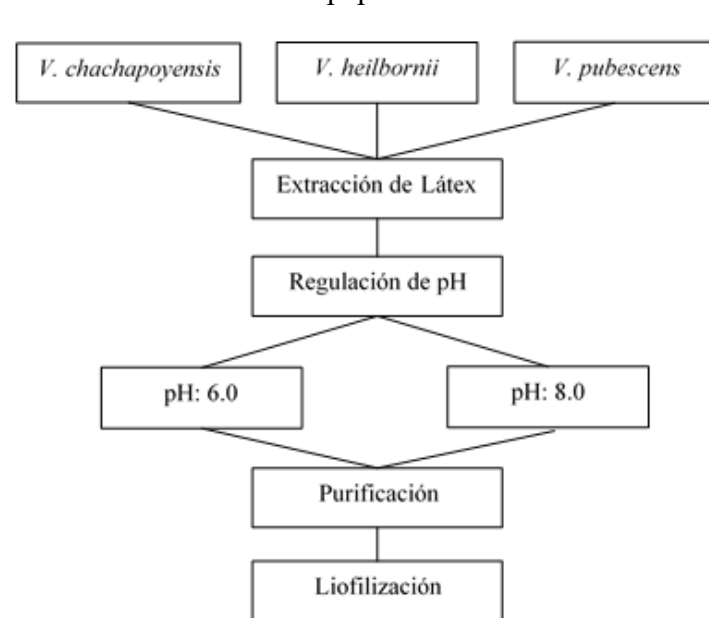
4.4. Extracción de la papaína

La extracción de papaína de la papaya implica una serie de pasos, que dependiendo del método utilizado pueden variar, los métodos de extracción poseen ventajas en términos de eficiencia, rendimiento y costos, dependiendo de la finalidad que se dará a la enzima o el tipo de producción que empleará un método puede ser más eficiente que otro, al aplicarlo a nivel industrial, puede que una extracción con solventes no sea tan eficiente en término de costos, pero sí a nivel de laboratorio, la elección del método de extracción depende de varios factores, como la fuente vegetal, equipo disponible, la escala de producción y los requisitos específicos de la papaína deseada. Además, es esencial optimizar las condiciones de extracción, como la temperatura, el pH, el tiempo de extracción y la relación sustrato/solvente, para lograr una extracción eficiente y una alta calidad de papaína (Arana, 2012).

Existen varios métodos utilizados para extraer papaína de la papaya, la primera es la extracción enzimática, en este método, se utiliza una solución enzimática para liberar la papaína de la fuente vegetal. Se añade una enzima proteolítica, como la bromelina o una enzima comercial de papaína, a la mezcla de pulpa de papaya. La enzima digiere las proteínas presentes en la papaya, incluida la papaína. Luego, se lleva a cabo una separación por filtración o centrifugación para obtener la papaína en la solución enzimática. Otro método de extracción efectivo es la extracción asistida por ultrasonido, este método utiliza ondas de ultrasonido para mejorar la eficiencia de extracción de la papaína. La pulpa de papaya se mezcla con un solvente o una solución tampón y se somete a ondas ultrasónicas. Las ondas ultrasónicas generan cavidades y turbulencias en la mezcla, lo que facilita la liberación y extracción de la papaína. Este método se considera más rápido y eficiente en comparación con la extracción convencional. En la extracción con solventes orgánicos se utilizan solventes orgánicos como alcoholes, cetonas o aldehídos para extraer la papaína de la fuente vegetal. La pulpa de papaya, semillas o cáscara se mezcla con un solvente orgánico, como etanol, metanol o acetona. El solvente extrae la papaína y otros componentes solubles. Luego, se realiza una separación por filtración o evaporación para obtener la papaína en forma de precipitado o

concentrado. Finalmente, en la extracción asistida por microondas, se emplea la radiación de microondas para calentar la mezcla de pulpa de papaya y solvente. La radiación de microondas genera un calentamiento rápido y uniforme, lo que acelera la extracción de la papaína. Este método se caracteriza por su velocidad y eficiencia. Vale la pena resaltar que las condiciones de la extracción son importantes, dado a que un calentamiento desmedido, un solvente que cambie abruptamente el pH de la solución pueden llegar a afectar las propiedades enzimáticas y degradar las enzimas extraídas, obteniendo una actividad enzimática mucho menor a la esperada (Nitsawang et al., 2006).

Figura 4.
Diseño de extracción de papaína



Nota. Adaptado de Rivera, *et al*, (2023)

4.5. Purificación de papaína

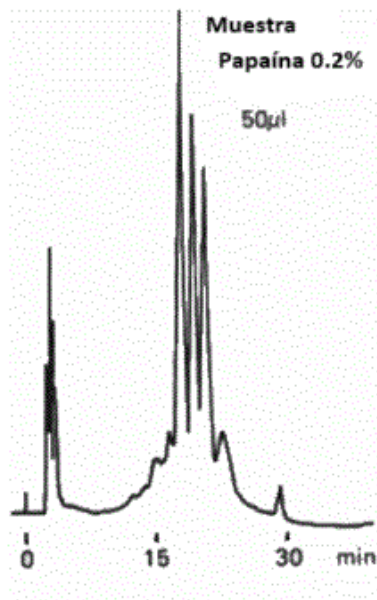
Existen muchas técnicas de purificación de enzimas y su elección dependerá del grado de purificación que se desee alcanzar, el presupuesto disponible y las características de la proteína a purificar, como peso molecular, carga, solubilidad y actividad biológica. Según la fuente de la proteína, esta estará acompañada de diferentes contaminantes, propios del extracto, la papaína contendrá residuos

orgánicos provenientes de las cáscaras o el látex de la papaya, tales como la clorofila u otros compuestos orgánicos, (Roe, 2001).

Uno de los métodos más comunes para la purificación de enzimas es la cromatografía de Intercambio iónico. Esta se basa en que la mayoría de las proteínas tienen cargas en su superficie por lo cual puede tener lugar una interacción entre ellas. En la cromatografía hay una fase móvil y otra estática, dependiendo de la carga de la fase estática. La fase estática deberá tener una carga diferente al de la proteína que se desea separar. Es preferible que la carga de la fase estática no varíe con un cambio en el pH. La separación ocurre, cuando iones presentes en la fase estática, son desplazados por las moléculas mediante un efecto de fuerzas de van der Waals y Coulomb, es importante tomar en cuenta que estas purificaciones requieren de un gran capital para poderse aplicar a nivel industrial (Roe, 2001).

Figura 5.

Cromatograma de intercambio iónico papaína



Nota. Adaptado de Shodex (2023)

Para poder lograr una separación más barata se pueden aplicar operaciones unitarias que permitan su aislamiento y eliminación de impurezas, tal es el caso de la filtración. En donde se escoge el medio filtrante y solvente según la naturaleza de la enzima, y la fuerza motriz de la operación es la presión. Durante la etapa de purificación de la papaína, se utilizan métodos de precipitación para concentrar la proteína. Estos métodos implican la adición de polímeros o ajustes en el pH y la fuerza iónica, ya que la solubilidad de la proteína está influenciada por la distribución de cargas en su superficie. El precipitado resultante se puede recolectar mediante procesos de filtración o centrifugación (Roe, 2001).

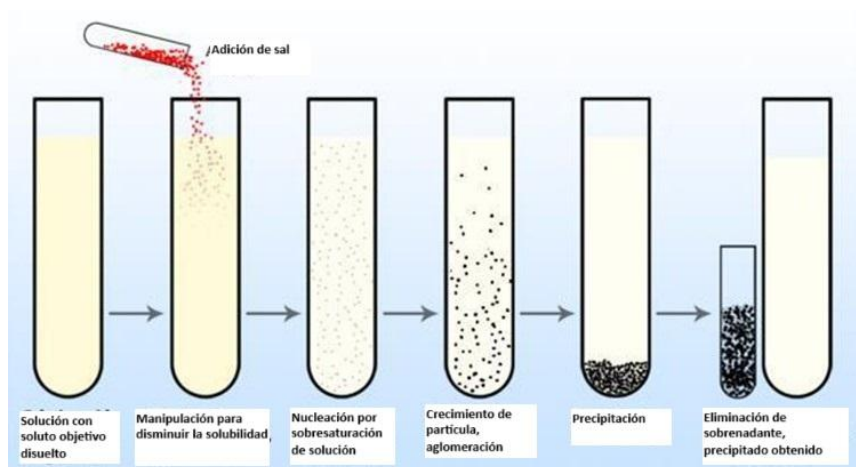
La precipitación mediante cambio de pH o precipitación isoelectrica implica ajustar el pH al punto isoelectrico de la proteína. En este punto, las cargas positivas y negativas de la molécula se neutralizan, lo que resulta en una atracción entre las moléculas y la formación del precipitado. También existe la posibilidad de precipitación mediante el aumento en la fuerza iónica, que es uno de los métodos más comunes. Consiste en agregar sales que no desnaturalizan la proteína y previenen la contaminación bacteriana. La precipitación ocurre debido a la agregación de los grupos hidrofóbicos expuestos en la superficie de la proteína después de la adición de sales. Cada uno de los iones de la sal es solvatado por el agua que rodea a la proteína, lo que promueve la formación del precipitado. Es importante realizar este proceso a una temperatura constante y preferiblemente baja para evitar la pérdida de actividad enzimática. El sulfato de amonio es una sal comúnmente utilizada debido a su bajo costo y solubilidad. La concentración de la sal se establece en forma de porcentaje de saturación, asumiendo que la muestra se satura de manera similar al agua. Se eligen diferentes porcentajes de saturación para lograr la precipitación de la papaína. El precipitado se recupera por centrifugación (Salunkhe y Kadam, 1995).

La precipitación mediante solventes orgánicos es similar a la precipitación isoelectrica, donde la adición de solventes orgánicos reduce la constante dieléctrica de la solución, lo que resulta en una disminución de la solubilidad de la proteína y la formación de agregados moleculares. Este proceso se favorece cuando el pH se acerca

al punto isoeléctrico de la proteína y cuando la proteína tiene un peso molecular bajo. Para evitar la desnaturalización de la proteína, es recomendable llevar a cabo este proceso a temperaturas inferiores a 0°C, considerando que la temperatura aumenta después de la adición del solvente orgánico (Nitsawang et al., 2006).

Figura 6.

Precipitación de enzimas por adición de sales de amonio.



Nota. Adaptado de Sánchez (2020).

4.6. Liofilización y secado al vacío

La liofilización, es un método de secado que se basa en la sublimación del hielo de un producto congelado. En este proceso, el agua pasa directamente del estado sólido al vapor, evitando la fase líquida. Para lograrlo, es necesario trabajar por debajo del punto triple del agua, (0.01°C y 4.5 mmHg). Aunque como proceso industrial se desarrolló en la mitad del siglo XX, sus principios ya eran conocidos y utilizados por los incas (Ramírez, 2006).

El proceso de liofilización implica la desecación primaria del producto mediante la sublimación del solvente congelado, principalmente, agua. Se logra reduciendo la presión en la cámara con una bomba de vacío y aplicando calor al producto (aproximadamente 550 Kcal/Kg para el agua), sin aumentar la temperatura. La conducción y radiación se usan comercialmente, combinando sus efectos al ubicar

el producto en bandejas sobre placas calefactoras separadas. La calefacción por microondas presenta desafíos y no se utiliza comercialmente (Ramírez, 2006).

Los niveles de vacío y calentamiento varían según el producto. Inicialmente, el hielo sublima desde la superficie del producto; a medida que avanza, la sublimación retrocede, requiriendo que el vapor pase por capas secas para salir. Este vapor se recoge en el condensador que debe enfriar todo el vapor a una temperatura inferior a la del producto (Cuper, 1965).

Es importante controlar la velocidad de secado y calentamiento para mejorar el rendimiento. Un secado rápido puede provocar pérdida de producto por arrastre, y un calentamiento veloz puede afectar la calidad. Para una liofilización efectiva, se debe controlar la temperatura y regular la presión total y parcial del sistema. La última etapa, desecación secundaria, implica la evaporación del agua no congelable, logrando un contenido final de humedad inferior al 2%. La temperatura de las bandejas puede aumentar sin riesgo de fusión, pero la presión se reduce al mínimo, utilizando la capacidad máxima de vacío posible. Es crucial controlar el contenido final de humedad para garantizar la estabilidad del producto (Cuper, 1965). Los equipos empleados en la industria varían en tamaño desde unos pocos kilogramos de hielo sublimado al día hasta aproximadamente dos toneladas. Debido a las particularidades del proceso, la gran mayoría de estos equipos operan de manera intermitente, ya que se añaden las materias que se desean liofilizar a una cámara y esta permite sublimar el hielo que se genera por la humedad de la materia prima. (Perera, 1996). Dentro de la cámara de liofilización o desecación se disponen bandejas huecas por las que circula el fluido refrigerante, y se ubica el producto, ya sea previamente congelado o no, dependiendo del tipo de liofilizador. El fluido refrigerante se hace circular según la fase del proceso en curso (Perera, 1996). La cámara de condensación está equipada con un conducto frío (condensador), su función es enfriar el vapor de agua generado en la cámara de liofilización, transformándolo en hielo que se adhiere a las paredes, evitando así su entrada en la cámara de vacío (Perera, 1996).

Las bombas de vacío utilizadas en los liofilizadores, generalmente se encuentran conectadas a ambas cámaras, al iniciar el proceso se cierra la conexión con la cámara de liofilización, pero no con la de condensación. Esto permite que el vapor producido sea dirigido al condensador. Gracias al vacío, se produce la sublimación del hielo, convirtiéndolo en vapor y provocando un progresivo secado del producto con una disminución de su temperatura. Posteriormente, es necesario suministrar calor a las placas. Una vez completada la sublimación, la temperatura del producto aumentará hasta igualarse con la de las placas calefactoras, y el vapor resultante será conducido hacia el condensador (Perera, 1996).

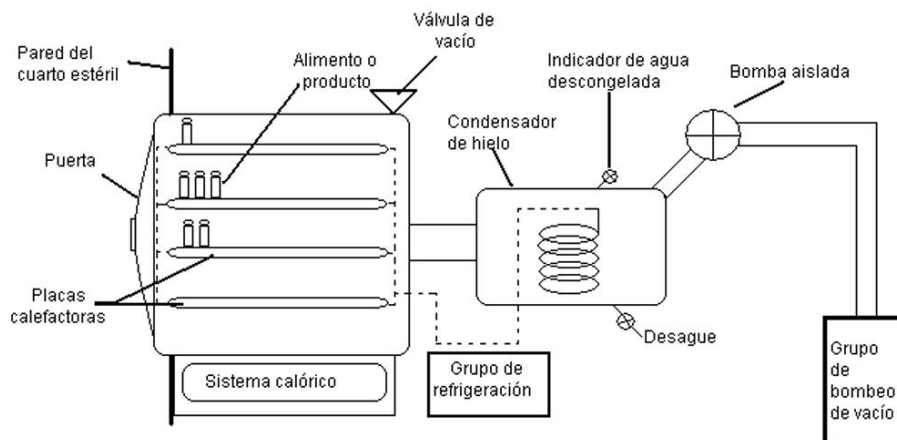
Ventajas de la liofilización:

- Conserva de manera más efectiva la estructura y la apariencia original del alimento.
- La baja temperatura de trabajo previene la alteración de productos sensibles al calor.
- La sublimación del hielo deja poros que facilitan una rápida reconstitución.
- Impide el deterioro del color y sabor debido a reacciones químicas, así como las pérdidas de propiedades fisiológicas.
- La humedad residual es mínima.
- Ofrece un prolongado tiempo de conservación.
- La retención de aromas es notablemente alta.

Desventajas de la liofilización:

- Requiere una significativa inversión en equipos.
- Conlleva un alto costo energético y un extenso tiempo de proceso, oscilando entre 4 y 10 horas por ciclo de secado.

Figura 7.
Esquema general de equipos de liofilización



Nota. Adaptada de Parzanese (SF).

A diferencia del proceso de liofilización, en el proceso de secado al vacío lo que más afecta al secado, es la disminución de la presión del entorno en el que se ubica el material, lo que consecuentemente reduce la temperatura de ebullición. Este fenómeno posibilita la evaporación del agua a temperaturas más bajas. (Martines, 2014)

Este proceso se lleva a cabo mediante diversos mecanismos, como la diferencia de presión, la difusión y la evaporación. La diferencia de presión surge porque la presión en la superficie es inferior a la del interior del material debido al vacío aplicado, lo que facilita la extracción del agua. Al reducir la presión, el agua alcanza su punto de ebullición a una temperatura más baja, provocando la evaporación desde la superficie y generando un gradiente de concentración entre la superficie y el interior, contribuyendo así al mecanismo de difusión. (Martines, 2014)

En las primeras etapas del proceso, se espera una alta velocidad de secado, ya que el agua de la superficie y las capas cercanas se extraen debido a la diferencia de presión y la evaporación. Posteriormente, la velocidad disminuye debido a la resistencia de transferencia de masa del flujo de vapor. Cuando se minimizan la

diferencia de presión, la concentración y los gradientes de temperatura en el material la materia prima termina secándose. (Martines, 2014)

En el secado al vacío, los mecanismos de transferencia de calor predominantes son la conducción y la radiación. La transferencia de calor por radiación proviene de una fuente como un calefactor eléctrico. o un medio calentado externamente. La conducción se produce principalmente por el contacto entre las partes que componen el material a secar. Al igual que la transferencia de masa, la transferencia de calor es máxima en las primeras etapas y disminuye gradualmente hasta alcanzar el equilibrio. (Martines, 2014)

El secado al vacío resulta ser ideal para materiales que podrían sufrir daños o alteraciones al exponerse a temperaturas elevadas. La aplicación del vacío elimina la humedad, previniendo la oxidación o posibles explosiones que podrían ocurrir al combinar ciertos materiales con el aire. Es especialmente útil en situaciones donde se requiere recuperar solventes o secar materiales hasta niveles muy bajos de humedad. A diferencia del secado a presión atmosférica, el secado a presiones más bajas reduce el punto de ebullición, generando una mayor diferencia de temperatura entre el medio calefactor y el producto. Esto conduce a un secado más rápido y a una recuperación más eficiente de calor (Maupoey, 2016). A pesar de esto, el secado al vacío implica un mayor consumo de materiales metálicos para la construcción de equipos más complejos en comparación con otros procesos. Además de eso, el secado al vacío. Requiere un elevado consumo de energía (Maupoey, 2016).

4.7. Cuantificación de la actividad enzimática

La eficacia de una enzima se expresa generalmente en términos de actividad. En general, esta actividad se puede cuantificar mediante unidades que se definen en función del peso del sustrato convertido en producto en un tiempo determinado. En el caso de la papaína, una enzima proteolítica, una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de un mol de sustrato en un minuto. La forma en que la enzima cataliza las reacciones está influenciada por factores como

la concentración del sustrato, la temperatura y el pH de la solución en la que se mide. Por lo tanto, es crucial establecer ambas condiciones para que la medición sea significativa y pueda utilizarse para comparaciones (Carrera, J. 2003).

Actualmente, existen tres tipos comunes de ensayos utilizados para medir la actividad de la papaína:

El método basado en la hidrólisis de moléculas de bajo peso molecular de sustratos sintéticos. Estos métodos son los más precisos, pero también los más costosos y menos relevantes para aplicaciones prácticas.

El método que se basa en el grado de hidrólisis de sustratos proteínicos. Hay una variedad de estos métodos debido a la diversidad de proteínas y metodologías disponibles. Sin embargo, son los más útiles y confiables siempre que se especifique la naturaleza y la fuente de la proteína utilizada, así como las condiciones del ensayo.

Los métodos basados en la capacidad de la enzima para coagular la leche. Aunque son más económicos en términos de materiales, requieren más tiempo. Los resultados se expresan en unidades de coagulación de leche (m.c.u. = milk clotting units).

4.7.1. Método Balls y Hoover

El método de balls y hoover, se basa en la capacidad de la papaína de coagular la leche, se basa en el tiempo que toma para una cantidad medida de papaína en coagular un volumen determinado de leche. Es un método, relativamente sencillo, debido a que no requiere de reactivos difíciles de conseguir ni procedimientos extensos. Las complicaciones de este método vienen derivadas a la baja exactitud, ya que se basa en el tiempo de coagulado y no en un valor específico como absorbancia o tiempos de retención en un cromatógrafo. Para que este método sea preciso, se requiere medir con otra técnica la cantidad de proteína no coagulada por la papaína, lo cual resulta más complicado si no se tiene la especificación de proteína de la leche,

el método utilizado puede ser el Kjeldahl para proteínas o determinación de proteínas por descomposición de compuestos. (Bermeo. 2019).

El método utiliza leche en polvo y el látex de la papaya como principales reactivos. Y los resultados se presentan en unidades de leche coagulada por gramo de solución enzimática.

4.7.2. Farmacopea de los Estados Unidos de América

El método USP, para cuantificación de papaína, determina de forma colorimétrica/espectrofotométrica la actividad enzimática de la papaína por degradación de caseína en unidades de tirosina, basado en el principio de que una unidad enzimática, hidroliza caseína para producir un color equivalente a 181 μg de tirosina por minuto, o especificado usando una concentración de enzimas que libera 40 μg de tirosina por mL de solución de prueba, la cual puede ser cuantificada espectrofotométricamente a una longitud de onda de 280 nm (USP 29, 2010).

El método posee las ventajas de que puede ser aplicado a estándares, materias primas y muestras de papaína cruda con trazas de lactosa u otros compuestos añadidos, es un método comprobado y replicado innumerables veces por la industria farmacéutica, por lo que es confiable y con resultados cuantificables. Las desventajas principales del método derivan del costo de este, ya que se requiere tener acceso a la farmacopea de los Estados Unidos para tener todas las condiciones del método, esto implica pagar una cantidad considerable para obtener la monografía en donde se detalla toda la metodología, además de esto, algunos de los reactivos que este utiliza son complicados de tener.

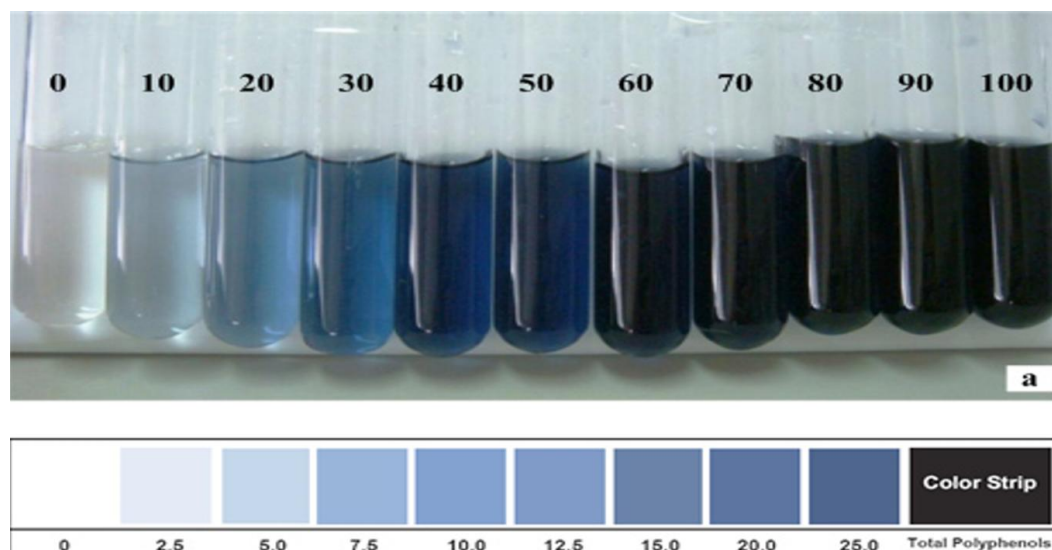
El método utiliza como principales reactivos la caseína, ácido cítrico, EDTA, fosfato dibásico de sodio, clorhidrato de cisteína y ácido tricloroacético.

4.7.3. Método Sigma Aldrich

Este método es empleado de manera similar al de la farmacopea de los Estados Unidos, debido a que se basa en el principio de que la actividad de una enzima proteolítica puede determinarse por la degradación de una proteína en aminoácidos cuantificables espectrofotométricamente, como la tirosina. Se diferencia del método USP, debido a que este utiliza el reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu, para generar un color azul en presencia de unidades libres de tirosina, el cual puede ser determinado espectrofotométricamente en una longitud de onda de 660 nm en un pH entre 7.5 y 8 a 37°C (Sigma Aldrich, 1999).

El método posee las ventajas de ser un método fiable, repetible y cuantificable, al igual que el método USP; sin embargo, las principales desventajas vienen derivadas de lo complicado que resulta obtener el reactivo colorimétrico, ya que este es costoso y difícil de conseguir o sintetizar. Además de esto cuenta con condiciones más rigurosas para el análisis de la actividad enzimática ya que la temperatura toma un papel importante en el tiempo que la solución mantiene el color cuantificable, ya que este se va degradando por el tiempo.

Figura 8.
Coloración del reactivo de Folin-Ciocalteu



Nota. Adaptado de Theppakorn y Ploysri (2014).

El método utiliza como principales reactivos, el carbonato de sodio, reactivo fenólico de Folin-Ciocalteous, fosfato de potasio, ácido tricloroacético, caseína, acetato de sodio y acetato de calcio (Sigma Aldrich, 1999).

4.8. Aplicaciones industriales

La papaína tiene diversas aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. En la industria alimentaria, se utiliza para suavizar carnes, clarificar cerveza, suavizar productos lácteos y mejorar la textura de alimentos procesados. En la industria farmacéutica, se emplea en la producción de medicamentos digestivos y antiinflamatorios. En la industria cosmética, se utiliza en la fabricación de productos para el cuidado de la piel y el cabello debido a sus propiedades exfoliantes y degradantes (Ramírez, 2019).

Durante la producción de salsa dulce, la papaya es transportada de forma manual o con ayuda de maquinaria, durante este proceso que transporta la fruta hacia las marmitas de cocimiento, se generan grandes cantidades de residuos, ya que las semillas, cáscaras y frutos que caen al piso no pueden estar en contacto con un producto para el consumo humano, ya que esto presenta un riesgo para la inocuidad del producto final. Estos residuos representan un desafío para la producción de salsa dulce y otros productos derivados o similares, ya que su eliminación puede ser costosa o bien, generar menores ganancias en el proceso, reprocesos y contaminación; sin embargo, la papaína que puede ser extraída de estos residuos se encuentra en mayor concentración en las hojas verdes, el látex (líquido lechoso del fruto inmaduro) y las semillas de la fruta. La papaína es una cisteína proteasa que posee diversas propiedades y aplicaciones industriales, lo que la convierte en un compuesto de alto valor añadido (Díaz, 2019)

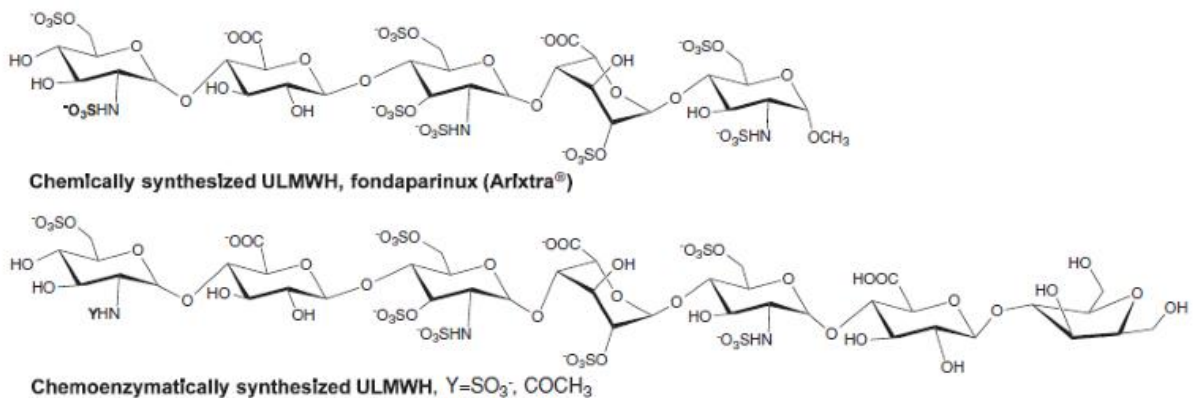
Además, la papaína es utilizada en la industria de alimentos en comida para neonatos, dado a que permite la degradación de compuestos que podrían llegar a ser complicados de digerir en un cuerpo humano poco desarrollado, facilitando así, su

asimilación en el cuerpo y la absorción de nutrientes en los intestinos (Camargo, 1996).

En la industria farmacéutica, se utiliza principalmente en la fabricación de heparina. Esta es un anticoagulante, usado para prevenir la aparición de coágulos en operaciones u otros procedimientos médicos. La heparina se extrae de tejido animal, como parte del intestino delgado, grueso, hígado o pulmonar principalmente de reses o cerdos. La fabricación comprende 4 fases principales: Extracción, purificación, fraccionamiento y refinamiento (Xianxuan, 2012).

Figura 9.

Estructura molecular de heparina sintetizada por enzimas



Nota. Adaptado de Xianxuan (2012)

En la fase de extracción se utilizan enzimas proteolíticas, como la papaína, con la finalidad de descomponer las proteínas de los tejidos, facilitando la liberación de la heparina, la papaína rompe los enlaces peptídicos de las proteínas, del tejido, liberando la heparina ligada a las proteínas del tejido. Una vez triturado el tejido, la solución enzimática de papaína es añadida, dejando que este actúe durante un tiempo. Después de la extracción, se precipita la heparina y se separan los otros componentes contaminantes como enzimas y otras proteínas presentes en la mezcla (Camargo, 1996).

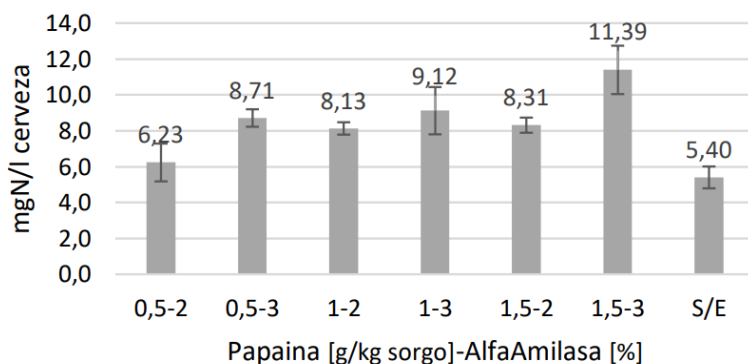
La heparina obtenida se somete a fraccionamiento para separar la heparina de alto peso molecular y la heparina de bajo peso molecular, ya que cada una de estas tiene diferentes capacidades anticoagulantes. En la fase de refinamiento la heparina se ajusta por medio de una reacción para modificar sus propiedades y mejorar su estabilidad (Camargo, 1996).

La papaína es ampliamente utilizada en la industria farmacéutica como tratamiento para parásitos intestinales por su función vermífuga y fabricación de enzimas digestivas, de venta masiva para la degradación de las porciones de alimentos y que la digestión sea más fácil para una persona (Starley, *et al*, 1999).

La papaína es ampliamente utilizada en la fabricación de cerveza, generalmente en la etapa de maduración para ayudar a la clarificación del mosto. En esta etapa se enfría el mosto durante un tiempo de varias semanas, por lo que se utiliza la papaína para evitar la formación de proteínas que puedan afectar la maduración. La papaína hidroliza las proteínas presentes, precipitándolas y eliminándolas del proceso, evitando así que la fermentación se enturbie en el almacenamiento o refrigeración. La papaína permite además estabilizar la cerveza y reducir los niveles de gluten incluso menores a 20 ppm. Una dosis máxima de 3 g/hL previene que se vuelva turbia la cerveza en la refrigeración, ya que elimina polifenoles y permite eliminar el gluten (Gómez, 2019).

Figura 10.

Aminoácidos libres en mosto de cerveza con papaína



Nota. Adaptada de Gómez (2019).

En la industria textil, la papaína es utilizada para retirar tejido graso del cuero, así como para estirar el cuero y eliminar protuberancias que podrían afectar la calidad del tejido. Se ha evaluado el uso de papaína en el proceso de pretratamiento del cuero, debido a que, en este se requiere de un uso de gran cantidad de químicos, que son añadidos directamente a la materia prima del cuero con la finalidad de eliminar el pelo que se encuentra adherido a la parte subcutánea de la piel, la papaína reemplaza este proceso principalmente porque puede eliminar el 100% de los contaminantes en el proceso de eliminación de pelo y dado a que es más sencillo utilizar una solución enzimática que puede reutilizarse a químicos que puede resultar más complicados de descartar (Quintero, Celis, 2009).

V. Antecedentes

En el año 2007, Adriana María Puig Rodríguez presentó el desarrollo del proceso para la extracción de papaína en Colombia. Esta investigación presenta el látex de los frutos inmaduros como la mejor alternativa para la extracción enzimática, comparándolo con extraer papaína de un extracto de la cáscara. El resultado final de la investigación indica una actividad enzimática de 7.5×10^{-4} (unidades de tirosina) para el extracto de cáscara comparado contra 1.5×10^{-2} (unidades de tirosina) para el extracto secado de látex de papaya. Sin embargo, este estudio no presenta un aprovechamiento de residuos, dado que se utilizan frutos inmaduros intactos, se utiliza el látex de la papaya puro y no se evalúa contra la extracción de enzimas de las semillas, fruto o cáscara. El trabajo está centrado en presentar la mejor alternativa de secado de látex y una propuesta de extracción a nivel semi industrial (Rodríguez, 2007).

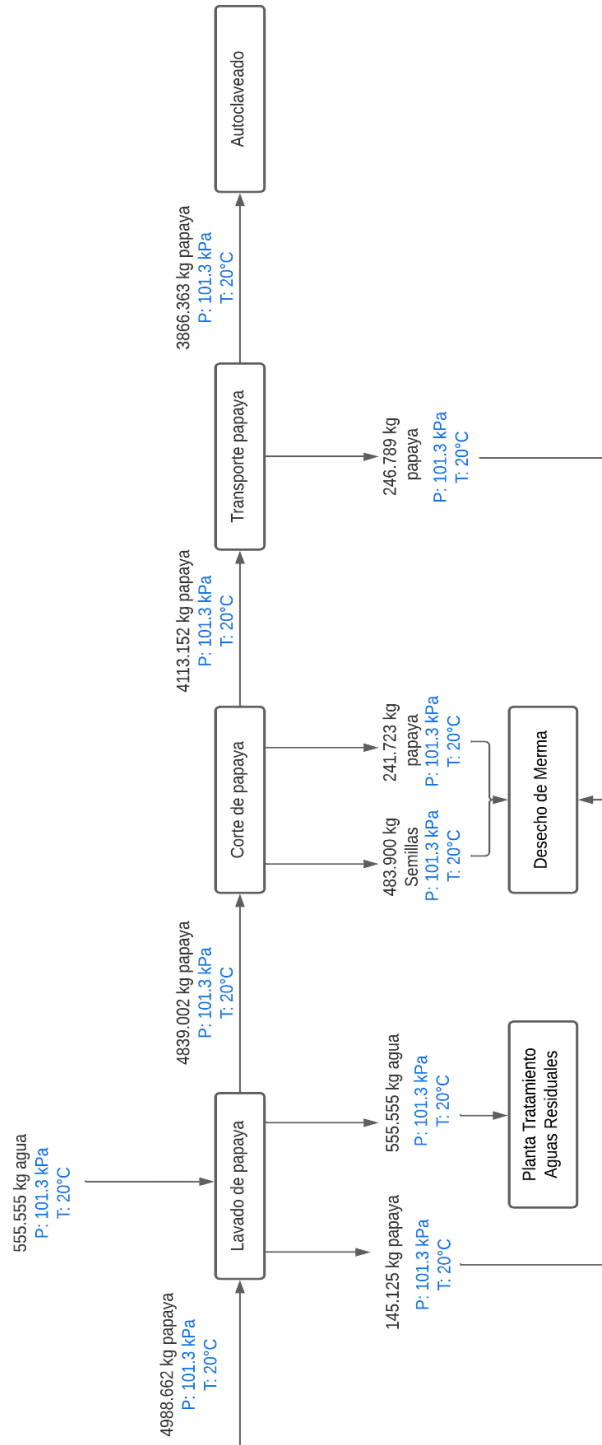
Otra investigación realizada en 2010 por Masita Bindi MD presenta una propuesta para el aprovechamiento de las hojas de papaya para la extracción enzimática de papaína. Su resultado final fue que la concentración máxima de aminoácidos es de 0.45 M, con un periodo de extracción máximo de 4 horas y 65°C utilizando tratamiento ultrasónico, con la recomendación de HPLC para la cuantificación real de enzimas de papaya. El trabajo está enfocado en presentar las condiciones óptimas de extracción y el mejor pretratamiento a utilizar con el fin de obtener la mayor cantidad de actividad enzimática; sin embargo, en este trabajo no se presentan resultados de utilizar fruto, semillas y cáscara, todas las muestras de papaína son precipitadas y extraídas sin utilizar el fruto crudo como punto de comparación (Bindi, 2010).

A pesar de que existen diversos estudios sobre la extracción enzimática de papaína y su cuantificación, no se encontraron comparativas de utilizar la papaya residual de un proceso de producción a nivel de Guatemala, ni su comparativa contra diversas fuentes de papaína como lo son la cáscara, el fruto y las semillas obtenidas de una merma de producción, pues durante el proceso se perderán una gran cantidad de enzimas.

La figura No. 11 muestra el procesamiento actual de papaya en la empresa de donde se obtuvieron las muestras analizadas. El balance de masa es un aproximado del promedio de los valores reales por confidencialidad de procesos y fórmulas.

Figura 11.

Balance de masa teórico para procesamiento de papaya industrial actual.



Nota. Elaboración propia.

VI. Metodología

6.1 Recolección de muestras

6.1.1. Materiales y equipo

- Bolsas plásticas, cualquier clase
- Recipientes de vidrio, cualquier clase
- Selladora industrial de bolsas plásticas FS-200C
- Espátula grande de laboratorio
- Macerador o procesador de alimentos Black and Decker FP4200BLA
- Pelador de fruta cualquier clase

6.1.2. Procedimiento:

Se solicitó una reunión con gerente de producción de Productos alimenticios centroamericanos, se informó sobre la investigación, los métodos a utilizar y las muestras necesarias para el trabajo, para la autorización de extracción de merma de la planta.

Se recolectó muestras de la merma del proceso de corte de papaya utilizando una espátula para no contaminar las muestras con las manos, se sumergió la espátula en recipiente de merma de fruto, en el cual se extrajo 0.4636 kg de fruto sin semillas, posteriormente empacó la bolsa plástica y se selló al vacío. Se realizó el mismo procedimiento con 0.4636 kg de merma de semillas de papaya.

Se retiró la cáscara a los frutos de papaya, estos se cortaron con un pelador dejándolos de un grosor aproximado de 1 mm, posteriormente, se procedió a cortar la fruta pelada en trozos cúbicos de entre 5 a 7 cm. Una vez separados, se procedió a reducir el tamaño de los trozos usando un procesador de alimentos, tanto para la cáscara como el fruto de papaya, se realizó el mismo procedimiento para la muestra de semillas, estas se agregaron directamente al procesador de alimentos hasta obtener una especie de pasta, se empacaron las muestras nuevamente al vacío y se almacenaron a una temperatura de entre -10°C a -20°C para evitar la descomposición de las muestras.

6.2 Secado

6.2.1. Materiales y equipo

- Muestras de fruto, semillas y cáscara de papaya
- Recipientes de vidrio de 200mL, de cualquier clase
- Liofilizador Labconco Freezone 4.5
- Recipiente de liofilizador Labconco Freezone 4.5
- Báscula de humedad Ohaus MB45
- Báscula analítica Ohaus PX163E
- Papel Aluminio de cualquier clase

6.2.2. Procedimiento:

Se utilizó la balanza analítica para pesar un aproximado de 10 g de muestra de fruto de papaya, este se colocó disperso de forma homogénea sobre toda la superficie del recipiente del liofilizador Labconco, se colocó en el liofilizador y se ajustaron las condiciones de operación en -40°C con vacío de 50×10^{-3} mbar durante un aproximado de 4 a 5 horas. Se realizó el mismo procedimiento en días diferentes para las muestras de semillas y cáscara de fruta, obteniendo 3 muestras por cada fuente de papáina.

Se determinó el porcentaje de humedad perdido durante el secado al vacío en el liofilizador, tomando muestras húmedas y determinando su humedad por cuatriplicado usando la báscula de humedad con un ciclo de secado normal de 100°C por 15 minutos y posteriormente tomando un peso similar de muestras secadas y utilizando las mismas condiciones de secado, los datos preliminares se muestran en el cuadro No. 6.

Se empacaron las muestras secadas en aluminio y se sellaron para evitar que estas se arruinaran o contaminaran previo a realizar la medición de la actividad enzimática.

6.3 Extracción enzimática

6.3.1. Materiales y equipo

- Beaker de 100mL
- Etanol 70% (v/v) no desnaturalizado, cualquier marca
- Centrifugadora Eppendorf 5804 R
- Probeta de 50 mL, cualquier marca
- Agua desmineralizada
- Recipiente para Liofilizador Labconco Freezone 4.5
- Liofilizador labconco Freezone 4.5
- Filtro Whattman No. 1
- Embudo buchner, cualquier marca

6.3.2. Procedimiento:

Se tomó una cantidad de 100 mL de extracto de cáscara de papaya, extracto de semillas y extracto de fruta de papaya cruda.

Se clarificó el extracto medido con la finalidad de eliminar partículas contaminantes u otros interferentes por medio de una filtración con filtros whattman No.1.

Se separó la solución de extracto de fruta, cáscara y semillas en porciones de 30 mL haciendo uso de una probeta, se depositó en diferentes recipientes y se añadieron 100 mL de etanol 70% (v/v) no desnaturalizado, con la finalidad de de

Se dejó reposar la solución durante 48 horas a una temperatura de entre 2-8°C en una cámara fría.

Se separó el precipitado obtenido por medio de una centrifugación a 5200 RPM por 15 minutos, una vez separada la mezcla. Se eliminó el sobrenadante y se purificó el precipitado obtenido en 50 mL de etanol no desnaturalizado al 70% (v/v).

Se procedió a realizar un secado del precipitado por vacío haciendo uso del liofilizador Labconco, las muestras se colocaron dispersas de forma homogénea sobre toda la superficie del recipiente del liofilizador, se ajustaron las condiciones de operación en -40°C de temperatura con presión de vacío a 50×10^{-3} mbar durante un aproximado de 4 a 5 horas. Se realizó el mismo procedimiento en días

diferentes para las muestras precipitadas del extracto de semillas y cáscara de fruta, obteniendo 3 muestras por cada fuente de papaína.

6.4 Medición de la actividad enzimática

6.4.1. Materiales y equipo

- Fosfato dibásico de sodio, Sigma Aldrich pureza >99% (m/m)
- Ácido Cítrico anhidro, Sigma Aldrich pureza >99% (m/m)
- Caseína de leche grado técnico Fischer Scientific
- Edetato disódico Sigma Aldrich, pureza >99% (m/m)
- Ácido Clorhídrico 1N Merck
- Hidróxido de sodio 1N Merck
- Ácido tricloroacético Merck pureza >99.5% (m/m)
- Agua desmineralizada, cualquier marca
- Pastillas de papaína de concentración conocida
- Tubos de ensayo vidrio, cualquier marca
- Pipetas de 10 mL, cualquier marca
- Balones aforados de 100mL cualquier marca
- Balones aforados de 250mL, cualquier marca
- Beakers de 50 y 100 mL, cualquier marca
- Espectrofotómetro Shimadzu UV mini 1240
- Plancha de calentamiento laboratorio, Cualquier marca
- Termómetro de mercurio de cualquier marca (0°C – 50°C)
- Potenciómetro de mano, HI98107 HANNAH instruments
- Filtros Whattman No. 1
- Embudo Buchner de vacío, cualquier marca
- Bomba de vacío, General electric 5KC35JN12G
- Kitasato 200 mL cualquier marca
- Mortero de vidrio, cualquier marca

6.4.2. Preparación de soluciones

- Se preparó una solución de 0.05 M de fosfato dibásico de sodio realizando una dilución de 0.71 g de reactivo en 50 mL de agua, diluyendo por completo y llevando a volumen con agua desmineralizada en un balón de 100 mL
- Se preparó una solución de ácido cítrico 0.05 M diluyendo 1 g de ácido cítrico en 50 mL de agua desmineralizada y llevándolo a volumen con más agua desmineralizada en un balón de 100 mL.
- Se preparó una solución 1N de NaOH con 4 g de NaOH en perlas diluido en 50 mL de agua, una vez enfriado se llevó a volumen con agua desmineralizada en un balón de 100 mL. Se preparó esta solución para ajustar el pH en caso se bajara a menos de 6.
- Se preparó la solución para el sustrato de caseína, diluyendo 1g de caseína grado reactivo en 50 mL de la solución 0.05 M de fosfato dibásico preparada anteriormente, Se colocó la solución en un baño maría con agua hirviendo, se controló el tiempo durante 30-40 minutos y se dejó enfriar, utilizando el potenciómetro, se ajustó el pH de la solución a 6 añadiendo ácido Cítrico, una vez nivelado el pH se procedió a llevar a volumen con agua desmineralizada en un balón de 100 mL. Esta solución se preparó cada día de la prueba de medición de actividad enzimática
- Para la preparación de la solución amortiguadora, se realizó una disolución de 1.78 g de fosfato dibásico de sodio en 100 mL de agua desmineralizada, diluyendo por completo. Se añadió a la solución 3.5 g de Edetato de sodio (EDTA) y se ajustó el pH a 6 utilizando la solución de ácido clorhídrico 1N y midiendo el pH con el potenciómetro, una vez alcanzado el pH necesario, se llevó a volumen la solución con agua desmineralizada en un balón de 250 mL. Esta solución se preparó 3 o 4 veces según se fue requiriendo.
- Se preparó una solución de 10% (m/v) ácido tricloroacético, diluyendo 10g de ácido tricloroacético sólido en 50 mL de agua desmineralizada y aforándolo en un balón de 100 mL.

6.4.3. Preparación de la muestra

- Para preparar las soluciones de la muestra cruda se pesaron 0.5 g aproximadamente de cada una de las muestras de fuente de papaína en cuatuplicado. Datos preliminares pueden observarse en el cuadro No.7 Se transfirieron a un balón aforado de 100 mL y se llevaron a volumen utilizando la solución amortiguadora que se preparó anteriormente.
- Para preparar las soluciones de la muestra precipitada y liofilizada, se pesaron 0.150 g aproximadamente de cada una de las muestras de fuente de papaína en cuatuplicado. Datos preliminares pueden observarse en el cuadro No.8 Se transfirieron a un balón aforado de 100 mL y se llevaron a volumen utilizando la solución amortiguadora que se preparó anteriormente.

6.4.4. Preparación del Estándar

- Para la preparación del estándar, se tomó el peso estándar de 10 tabletas, se trituraron en un mortero, se separaron las partículas grandes que generalmente eran parte del revestimiento por medio de un colador de cocina.
- Se pesó el aproximado a 1 tableta, obtenido del promedio de las 10 tabletas pesadas anteriormente y se preparó una solución de 100 mL llevando a volumen con la solución amortiguadora preparada anteriormente.
- Se realizaron 5 diluciones de la solución madre inicial, diluyendo 2.5, 5, 7.5, 10 y 12.5 mL en 100 mL de agua desmineralizada, con la finalidad de construir la curva de calibración para la medición de la actividad enzimática.

6.4.5. Medición de la actividad enzimática

- Para la medición de la velocidad enzimática, se pipeteó 5 mL de la solución del sustrato de caseína preparada en 7 tubos de ensayo rotulados diferentes, 4 para muestras y 3 para los blancos.
- Se colocaron en un baño maría a 40 °C medidos con termómetro y se dejaron por 10 minutos.

- Una vez pasado el tiempo, se sacaron las muestras del baño maría y se procedió a pipetear 1.5 mL de la muestra y 0.5 mL de solución amortiguadora. En el caso de los blancos, se pipeteó 1.5 mL de agua desmineralizada.
- Se dejó reposar la muestra por una hora cronometrada, y finalizado el tiempo se procedió a pipetear 3 mL de la solución de ácido tricloroacético.
- Se colocaron las muestras nuevamente en el baño maría a una temperatura de 40 °C medidos con termómetro y se dejaron por 40 minutos hasta observar que la proteína precipitada se coagulara completamente.
- Una vez pasado el tiempo, se sacaron las muestras del baño maría y se filtraron al vacío con un Kitasato y bomba de vacío. Se descartó el precipitado y se recuperó la solución filtrada en tubos de ensayo limpios.
- Se preparó el espectrofotómetro, seleccionando la longitud de onda en 280 nm y se blanqueó con agua desmineralizada.
- Se leyeron las absorbancias de la muestra, en el espectrofotómetro, realizando 5 mediciones por cada una, incluyendo los blancos.
- Se realizó este procedimiento 6 veces en total, por cada muestra obtenida; así como para los 5 estándares de la curva de calibración.

VII. Resultados

Cuadro 1.

Actividad enzimática fuentes de papaína

Fuente	U/g±(σ²) Crudo	U/g±(σ²) Precipitado
Cáscara	11404.377±418.480	264129.317±2671.280
fruta	45999.284±1944.804	257410.087±2788.890
Semillas	91348.019±1472.610	280860.202±3386.890
Tableta*	541353.383	541353.383

U/g: Unidades USP papaína sobre gramo de producto.

Datos de tableta calculados respecto al valor teórico brindado por el fabricante.

Método USP de cuantificación de papaína a nivel de laboratorio utilizando tres partes de fruta para comparación.

Cuadro 2.

Prueba T para determinación de diferencia de medias comparativo entre muestra cruda y precipitada

Fuente	Valor P	Conclusión
Cáscara Precipitada/Cruda	1.33147E-34	Existen diferencias significativas
Fruto Precipitado/Crudo	1.71012E-37	Existen diferencias significativas
Semilla Precipitada/Cruda	1.81258E-50	Existen diferencias significativas

Valores P obtenidos de un análisis de prueba T, para indicar si existe significancia entre la actividad enzimática obtenida de las muestras crudas y precipitadas (Objetivo específico 2)

Cuadro 3.

Prueba post hoc Tukey para precipitados

Comparativa	Valor P	Conclusión
Fruta/Cáscara	0.004010074	Existen diferencias significativas
Fruta/Semilla	-1.75415E-14	Existen diferencias significativas
Semilla/Cáscara	5.42139E-11	Existen diferencias significativas

Posthoc Tukey, utilizado para determinar la mejor fuente de papaína de las muestras precipitadas y centrifugadas. Se determina cuál de las tres muestras analizadas es significativamente mayor al resto de muestras, que no se podría determinar utilizando un análisis ANOVA.

Cuadro 4.

Prueba post hoc Tukey para crudos

Comparativa	Valor P	Conclusión
Fruta/Cáscara	-1.77636E-14	Existen diferencias significativas
Fruta/Semilla	-1.77636E-14	Existen diferencias significativas
Semilla/Cáscara	-1.77636E-14	Existen diferencias significativas

Posthoc Tukey, utilizado para determinar la mejor fuente de papaína de las muestras Crudas. Se determina cuál de las tres muestras analizadas es significativamente mayor al resto de muestras, que no se podría determinar utilizando un análisis ANOVA.

Cuadro 5.

Comparativo de actividad enzimática crudos contra pastillas

Fuente	Comparativo Promedio	Desv. Estándar	C.V.
Cáscara	0.02107	0.00165	7.841%
fruta	0.08497	0.00768	4.549%
Semillas	0.16874	0.00581	6.840%

Comparativo como rendimiento promedio de actividad enzimática obtenida de las muestras crudas, tomando como punto de comparación la actividad enzimática obtenida por una pastilla de papaína comercial, unidades de comparativo (U USP (MX)/U USP(S)) (objetivo específico 3)

Cuadro 6.

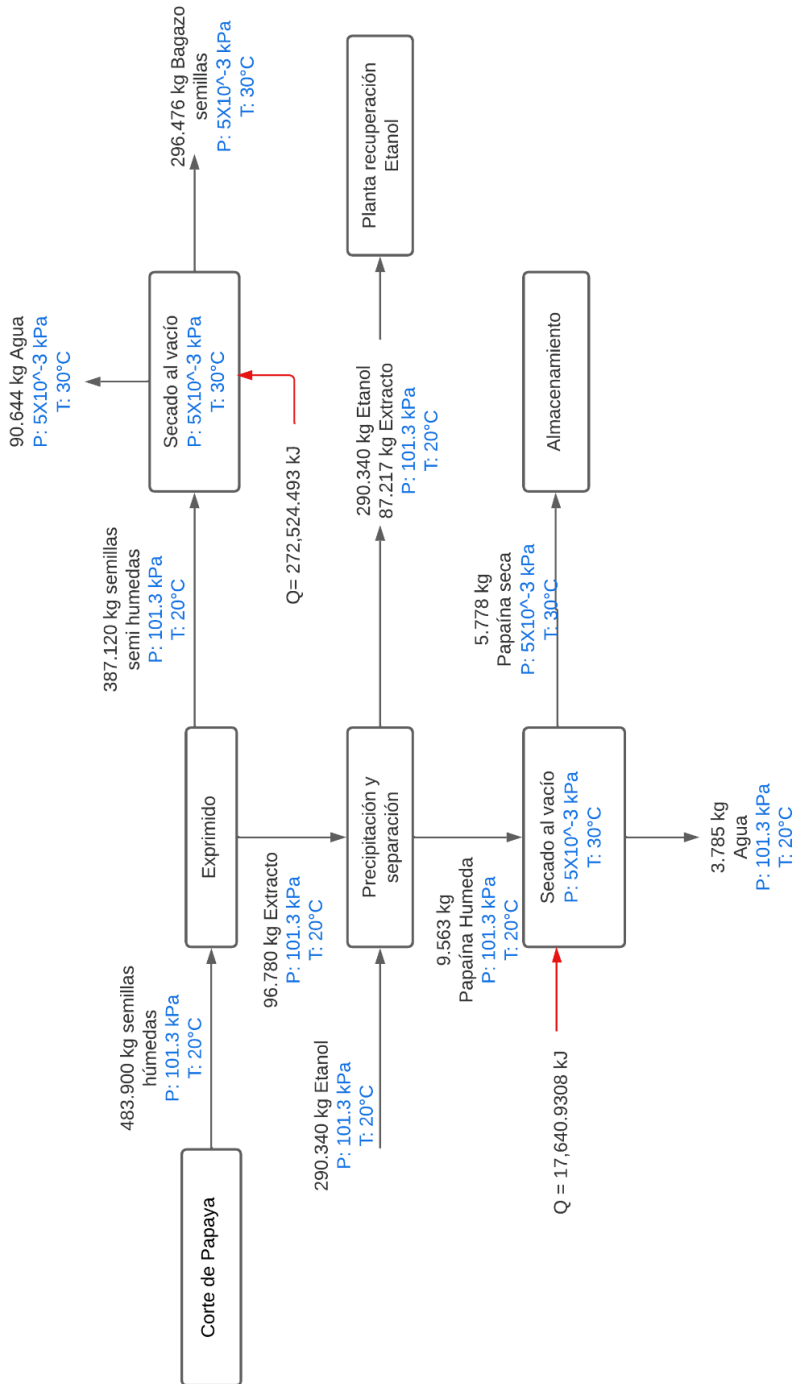
Comparativo de actividad enzimática precipitados contra pastillas

Fuente	Comparativo Promedio	Desv. Estándar	C.V.
Cáscara	0.48791	0.01054	2.161%
fruta	0.47653	0.01326	2.784%
Semillas	0.51881	0.01101	2.122%

Comparativo como rendimiento promedio de actividad enzimática obtenida de las muestras precipitadas, tomando como punto de comparación la actividad enzimática obtenida por una pastilla de papaína comercial, unidades de comparativo (U USP (MX)/U USP(S)) (objetivo específico 3)

Figura 12.

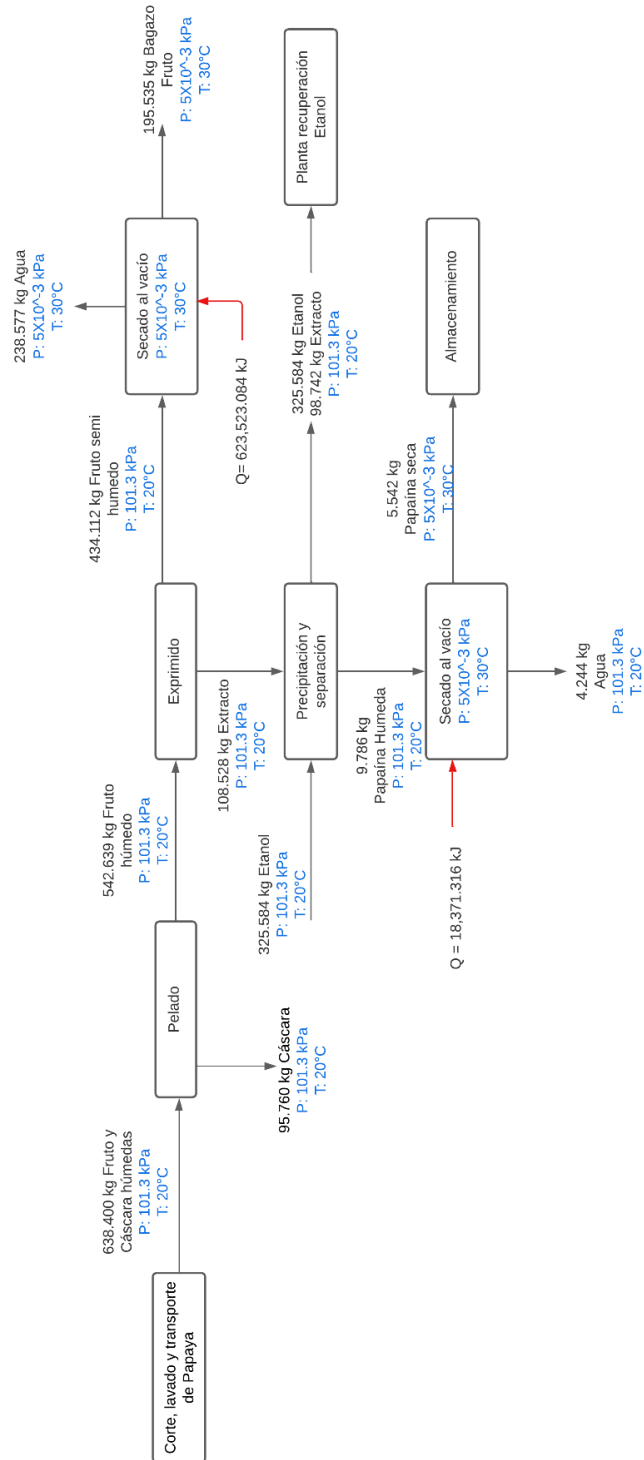
Balance de masa y energía propuesta proceso extracción enzimática semillas de papaya por lotes



Nota. Elaboración propia. Base de cálculo 1 hora de proceso.

Figura 13.

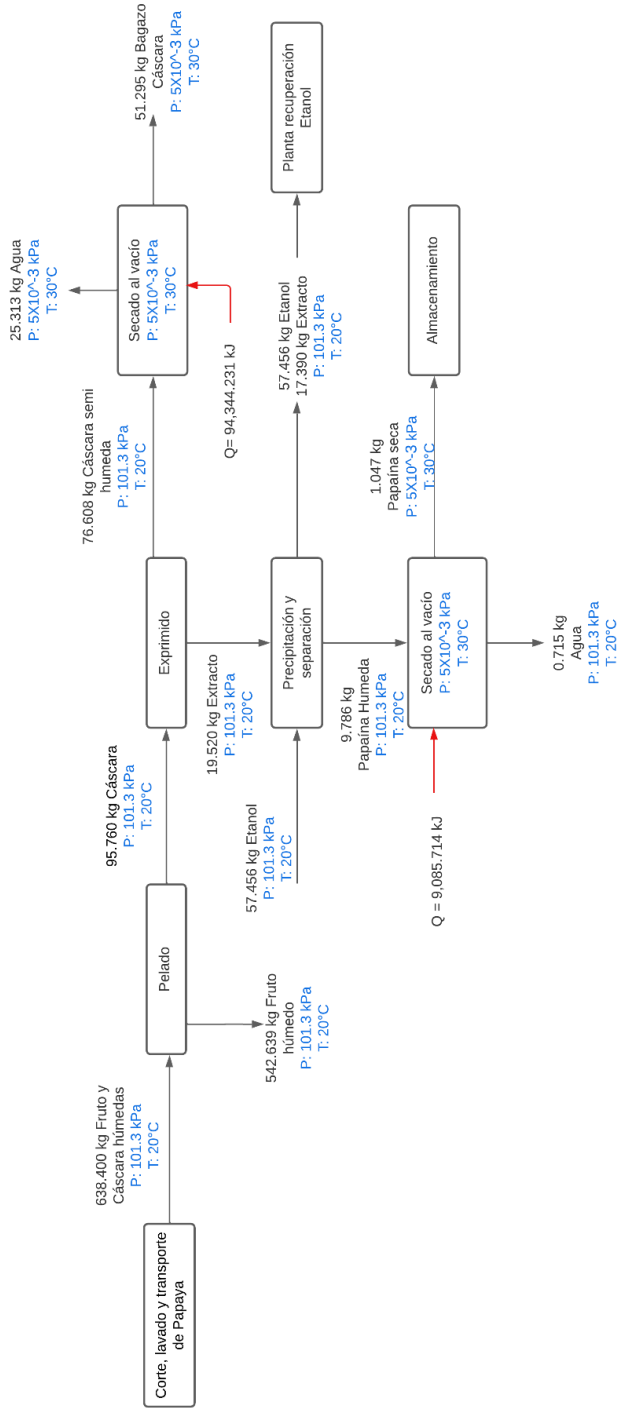
Balance de masa y energía propuesto proceso extracción enzimática fruta de papaya



Nota. Elaboración propia. Base de cálculo 1 hora de proceso.

Figura 14.

Balace de masa y energía propuesta proceso extracción enzimática cáscara de papaya por lotes.



Nota. Elaboración propia. Base de cálculo 1 hora de proceso.

VIII. Discusión de resultados

Para poder iniciar con la extracción de la enzima, y definir que la muestra sea representativa del proceso industrial, se seleccionó una muestra significativa del total de la merma de producción, por motivos de confidencialidad de la empresa con la cual se está elaborando el presente trabajo de graduación, el dato de merma total presentado es una aproximación al valor real, planteado en el balance de masa de la figura 10. El proceso productivo genera merma diariamente, por lo que fue indispensable seleccionar una muestra que no tuviera días almacenada para evitar la degradación de las enzimas, para esto, se extrajo la muestra de los tanques de recolección de mermas del mismo día, lotes producidos aproximadamente 4 horas previas.

Dentro del proceso, se realiza un lavado a la fruta previo al corte, por lo que tanto el agua como el fruto se traslada hacia el proceso de cortado en donde se reduce el tamaño de los frutos, al realizar los cortes de la papaya y estar en constante contacto con agua, la presencia de látex se elimina, esto es debido a que para el proceso industrial y dado a que se trata de un producto para consumo humano, la presencia del látex de papaya no debe encontrarse dentro del producto final, debido a que este es un alérgeno que puede ocasionar problemas en mujeres embarazadas y otras personas alérgicas a este producto, a quienes en algunos casos, les podría llegar a causar anafilaxia (Rojas, et al, 2018). Por lo que se descartó su análisis en el presente trabajo, pese a ser una de las mejores fuentes de papaína del fruto comparándolo contra las otras fuentes de papaína como lo son cáscara, fruto y semillas, llegando a ser incluso 1.84 veces mayor al encontrado en las otras fuentes de papaína mencionadas anteriormente (Gutiérrez, et al, 2017). Las semillas también son eliminadas del fruto, dado a que en el producto final estas aportan amargor y dañan las propiedades organolépticas, por lo que son pasadas en una lavadora rotatoria de 3 metros de largo, en donde en algunas ocasiones se utiliza agua para facilitar la eliminación; sin embargo, esta agua de lavado no se tomó en cuenta dentro del balance de masa planteado en la figura 10, dado a que históricamente en la empresa solo se utiliza cuando la producción es alta, que es como máximo 3 o 4 veces por mes y debido a que generalmente la lavadora rotatoria elimina la mayoría de estas, cuando la producción no requiere un lavado de un volumen alto de papaya.

Las muestras extraídas se mantuvieron en refrigeración previo al procesado, dado a que extraerlas de la merma y transportarlas a temperatura ambiente implicaría varias horas de degradación de las enzimas, las muestras extraídas se procesaron con la finalidad de reducir el tamaño y facilitar la liberación de las enzimas dado a que esta se encuentra dentro de las células del fruto y semillas, por lo que romper la pared celular es necesario para facilitar este proceso (Castillo, 2022). De igual forma, de cada muestra se extrajo un extracto del cual se realizó la precipitación de enzimas analizada en los resultados.

Para realizar un balance de masa fue necesario realizar un análisis de humedad, tanto para las muestras crudas sin secarse, las muestras crudas secas, los precipitados extraídos húmedos y los precipitados extraídos previo al secado. Los resultados previos del cuadro 6 y 7 muestran las humedades encontradas utilizando una balanza de humedad Ohaus MB 45, con un ciclo de secado de 10 min a 100°C.

Al analizar los resultados, se puede inferir que la pasta de fruta tiene la mayor cantidad de humedad, por la misma naturaleza de esta, que generalmente tiene un 91% (m/m) de su peso de agua cuando se encuentra inmadura (Gutierrez, et al, 2009); sin embargo, a esta pasta se eliminó parte de su agua superficial al sacar el extracto para la precipitación de enzimas dejando únicamente 57.0425% (m/m) de humedad dentro de esta. Este resultado tuvo una alta variabilidad presentando una desviación estándar de 0.016523, la cual al compararse con las otras llega a ser entre 3 a 4 veces mayor que las otras fuentes de papaína cruda, generalmente la muestra quedaba pegada como una masa después de realizar el secado, se pudo observar que el secado no fue uniforme en toda la muestra, mostrando áreas en donde todavía existía un poco de humedad; sin embargo, no se realizó otro proceso de secado para que el proceso de medición fuera uniforme para todas las muestras y de esta forma no se varía el método experimental para estas muestras en específico. La fuente de papaína cruda con la menor cantidad de humedad fueron las semillas, presentando un 26.6150% (m/m) en promedio en los 4 ensayos realizados, a pesar que la humedad de las semillas de papaya cruda varía entre 10 y 15% (m/m), en el proceso industrial, estas quedan sumergidas durante mucho tiempo en el agua residual del proceso y son recolectadas varias horas después de la

producción, además debido al corte y al proceso de eliminación de semillas industrial, algunas semillas se vuelven una masa que retiene una mayor cantidad de agua, por lo que cuando se realizó el exprimido para obtener el extracto de semillas, esta quedó con una cantidad significativa de agua.

Al observar el cuadro 7 se observa que la humedad más alta del precipitado fue la de la fruta precipitada; sin embargo, existe baja variabilidad entre estos resultados y los obtenidos de las otras fuentes de papaína, teniendo desviaciones estándar similares entre 0.002971 y 0.0038, por lo que se infiere que todos los precipitados tenían retienen una cantidad similar de agua al tratarse de una masa que se compone en su mayoría de papaína. Al realizarse el centrifugado y filtrado de las muestras, se obtuvo una masa de precipitado similar de los 3 extractos de fruta, cáscara y semillas, por lo que no se puede inferir una diferencia significativa entre las humedades obtenidas por estas; sin embargo, al igual que durante el proceso de secado de la masa de fruta húmeda, se observó que en el análisis de humedad del precipitado de todas las muestras, existían partes húmedas tanto por debajo como en el centro de las muestras, indicando así un secado incompleto, aunque es mínima, esta diferencia pudo ser el diferenciador entre las humedades obtenidas por los precipitados.

Los resultados de los cuadros 6 y 7 también muestran las humedades obtenidas por el secado de estas. Puede observarse en el cuadro 6 que la menor humedad obtenida de las muestras de fruta cruda fue el de la cáscara seca, siendo esta de 1.8075% (m/m) en promedio y la muestra que retuvo la mayor cantidad de humedad fue la pasta de semillas, siendo esta de 3.20% (m/m) en promedio; para las 3 muestras secas se observa una desviación estándar bastante baja, entre el 0.000560 a 0.003116, principalmente, porque el proceso de secado en estos casos se detenía antes de terminar el tiempo de 10 minutos de secado, indicando que para las tres muestras, el proceso fue suficiente para secar por completo las muestras y determinar la humedad de estas, al tener una cantidad de agua muy baja. De la misma forma, el secado de las muestras de precipitado, se obtuvieron bajas desviaciones estándar para las tres muestras, siendo la menor para el precipitado de semillas secas, con una humedad de 1.1925% y el mayor el del precipitado de la cáscara con una humedad de 1.5125% (m/m); no obstante, la variabilidad de estas humedades es mínima, ninguna de estas superó el 2%

(m/m) de humedad, infiriendo así que todas las muestras precipitadas se trataban en su mayoría de una masa de papaína sin purificar, por lo que la única diferencia existente en estas sería el nivel de pureza.

Los cuadros 8 y 9 muestran las diferencias obtenidas entre las humedades del producto sin secar, contra los productos secados. Dentro del cuadro 8 se observa que el proceso de secado fue más eficiente en la pasta de fruta cruda, dado a que se obtuvo una diferencia de 54.958% (m/m) en promedio, mientras que, para la pasta de semillas, únicamente se obtuvo una pérdida de humedad del 23.4150% (m/m) en promedio. Se puede inferir que uno de los factores que pudo ser determinante en la pérdida de humedad es el tiempo de secado, dado a que no se estableció un tiempo estándar de secado, sino que se sacaron las muestras del equipo liofilizador en cuanto se observó visualmente que no existía una humedad en los productos, llegando a realizar incluso varias revisiones, parando el equipo, sacando la muestra para una revisión visual y reiniciando el proceso de secado, por lo que no fue un proceso constante en el que se extrajo la muestra después de un tiempo establecido, sino hasta que este terminara. Además de esto, la fruta de papaya, como se explicó anteriormente, tiene la cantidad más alta de agua por la naturaleza del producto, parte de esta agua es agua no ligada que se pierde fácilmente en el proceso de secado, el fruto de papaya, además tiene una mayor porosidad que las semillas de papaya, por lo que en el proceso de secado al vacío, es probable que esta se haya perdido más fácilmente en la fruta debido a su porosidad que en la cáscara o semillas, en donde a pesar de romper las paredes celulares, la extracción del agua no ligada es más complicada. En cuanto al cuadro 9, puede observarse que de la misma forma que la fruta cruda, esta es la que más humedad perdió en el proceso de secado, siendo del 43.37% (m/m) en promedio, y la del precipitado de semillas de la misma forma es la menor cantidad de humedad perdida siendo únicamente 39.5775% (m/m) en promedio, solamente un 3.7925% (m/m) de diferencia respecto al promedio de la mayor pérdida, por lo que no existe una diferencia significativa en la humedad de estos productos.

Otro factor clave de la eficiencia de secado fue el manejo de las muestras, puesto a que se utilizó un equipo liofilizador, se intentó mantener condiciones de liofilización en la mayor parte del proceso, todas las muestras fueron congeladas y se metieron a temperatura

de congelación al liofilizador; sin embargo, como se mencionó anteriormente, los tiempos de secado no fueron estandarizados para todas las muestras, por lo que dentro del tiempo en el que se finalizaba el proceso de secado, las muestras se descongelaban y no se utilizó algún método para mantenerlo a una baja temperatura, por lo que este proceso fue más el de un secado al vacío que el de una liofilización. El recipiente en donde se colocaban las muestras para el liofilizador al conectarse al equipo se mantenía en una posición inclinada, por lo que para el caso de las masas de semillas y fruto crudo, así como para todos los precipitados, al irse secando las muestras, estas se despegaban del frasco y se quedaban en una sola parte del frasco, dificultando su secado ya que se disminuía su área superficial; con la cáscara cruda al tratarse de trozos de material en vez de una masa, se mantenía con un área superficial más grande, pegado sobre toda la superficie del frasco, facilitando el secado y reduciendo su tiempo significativamente en comparación con las otras muestras.

El proceso de precipitación de enzimas se realizó realizando diluciones de el extracto en etanol a una concentración del 70% (v/v) sin desnaturalizar, siendo esta una dilución en alcohol 3:1, al añadir el solvente de alcohol u otro solvente orgánico como acetona, la solubilidad de las proteínas dentro del extracto disminuyen, ya que las interacciones solubilizantes del agua y los grupos de la proteína se rompen, la interacción entre proteínas aumenta y las interacciones entre la proteína y el agua disminuyen, bajando la movilidad de las cargas proteicas, y precipitando la enzima (Tébar, 2009). Este proceso es más efectivo en bajas temperaturas, por lo que se realizaron las diluciones y se mantuvieron en refrigeración durante algunos días, hasta observar la formación de precipitado. Además de la cantidad de papaína que estas puede producir, puesto que se observa que la cantidad de papaína obtenida por las semillas es de 9.881% (m/m) únicamente 0.864% (m/m) mayor que la obtenida en el fruto, la cual tuvo un porcentaje de actividad enzimática de 9.017% (m/m) al compararse contra la pastilla comercial, según los resultados del cuadro 57; sin embargo, los pesos de precipitado se vieron afectados por el modelo de centrifuga utilizada, esto es debido a que para las muestras de extracto de cáscara y extracto de semillas se utilizó el modelo de centrifuga 1 descrito en el cuadro 74, y la muestra de extracto de papaya se centrifugó utilizando la centrifuga 2, esta diferencia, aunque mínima es significativa, ya que para centrifugar la misma cantidad de solución se tuvo que utilizar una mayor cantidad de tubos

en la centrifuga 2 que en la centrifuga 1, esto se puede observar en los cuadros 12,13 y 14, aumentando el error en el pesado y recuperando menos muestra al momento de sacarla de los tubos para realizar el secado de la muestra.

A pesar de que se obtuvo un peso de precipitado similar; y dado a que no se utilizaron otras técnicas de precipitación, el precipitado obtenido no se estableció como una muestra de 100% (m/m) papaína. El etanol utilizado para la precipitación de la enzima no es específico para reducir la solubilidad de las enzimas, si no, de proteínas en general por lo que cualquier traza de proteína presente en el extracto, también precipitó junto con la papaína. Proteínas como los albuminoides y peptonas presentes en los extractos, que pueden ser eliminados utilizando una mezcla de subacetato de plomo, como un proceso previo a la precipitación alcohólica, el cual precipita estos compuestos sin precipitar la proteína, eliminándolo las trazas de plomo con ácido sulfhídrico caliente (Cano, et al, 2004); sin embargo, en este trabajo de graduación, utilizar estas sustancias implica, procesos posteriores para la eliminación de los compuestos utilizados para eliminar impurezas, complicando el objetivo del estudio.

Se observó que el precipitado del extracto de semillas, fruto y cáscara contenían otros compuestos precipitados, como ejemplo de esto se observa las figuras 26 y 27, en la cual la coloración de esta no coincide con las especificaciones de la papaína, la cual si es purificada tiene una tonalidad blanca (Vidal, 2009). Además de esto, la velocidad de centrifugación se estableció en 5200 RPM, el máximo de revoluciones alcanzado por la centrifuga 2 utilizada para el extracto de fruto de papaya, ya que a pesar que la centrifuga 1 tiene una velocidad de centrifugación más alta, se mantuvieron las mismas condiciones de operación para todas las muestras para no introducir variabilidad en los resultados, afectando así también la cantidad de precipitado obtenido en todas las muestras.

La medición de la actividad enzimática se basó en un método modificado de la versión descrita por la farmacopea de los estados unidos, la cual se basa en una forma colorimétrica/espectrofotométrica de medir la actividad enzimática de la papaína por degradación de caseína en unidades de tirosina, ya que la papaína hidroliza la caseína para

producir un color equivalente a 181 μg de tirosina por minuto, o especificado usando una concentración de enzimas que libera 40 μg de tirosina por mL de solución de prueba, se situó la longitud de onda en 280 nm, según el método descrito (USP 29, 2010). Las soluciones de muestras fueron tratadas utilizando un buffer de fosfatos y Edetato disódico, diferenciándose el procedimiento debido a que según la metodología USP, este buffer tendría que utilizar clorhidrato de cisteína mono hidrato, ya que este previene la oxidación y debilitamiento en las estructuras de las proteínas, por la formación de puentes disulfuro formados en las proteínas que debilitan las estructuras, reduciendo la actividad enzimática significativamente y este puede actuar como un nucleófilo en las reacciones enzimáticas (Tébar, 2009); sin embargo, debido a que las soluciones fueron preparadas justo antes de ser medidas espectrofotométricamente, la degradación de la enzima en el buffer es despreciable para el objeto de estudio.

Para la medición de la actividad enzimática, se realizó una regresión lineal, de 5 puntos de calibración, realizando diluciones a una solución madre de pastillas comerciales de papaína. Se puede observar en la figura 15, la baja variabilidad de los 5 ensayos realizados, mostrando un comportamiento lineal con un coeficiente de correlación de 0.9483. Se calculó la actividad enzimática de las pastillas estándar basándose en las especificaciones indicadas por el fabricante, 6000 unidades USP por mg de papaína, teniendo estas 60 mg de papaína por tableta, deja una actividad enzimática de 360,000 U USP por tableta. Al determinarse el peso promedio de 10 tabletas, se obtuvo la actividad enzimática de todos los puntos de la curva basándose en las diluciones realizadas y la absorbancia obtenida en todos los puntos; sin embargo, al tratarse de un producto comercial y no de un estándar de papaína puro, se tienen excipientes y otros principios activos que no se tomaron en cuenta dentro de las mediciones, como es el caso de la diastasa fúngica presente en las pastillas, aunque en menor concentración, estas se tratan de enzimas beta amilasas, que descomponen carbohidratos en azúcares más simples, afectando la actividad proteolítica de la papaína causando desviaciones de los resultados, a pesar de que la papaya también contiene enzimas amilasas, las cuales también fueron precipitadas al realizar las diluciones en etanol, no se estableció un método para la cuantificación de estas, por lo que se desconoce su concentración dentro de las muestras crudas como de las muestras precipitadas y si la concentración es comparable

con la concentración establecida en el producto comercial utilizando como estándar, por ende, se infiere que estas pudieron tener un efecto en los comparativos contra el estándar obtenidos de la actividad enzimática de las muestras.

Las absorbancias obtenidas por las muestras se observan en los cuadros 15 al 20, sin embargo, estos datos poseen desviaciones debido a que la línea base utilizada en la medición espectrofotométrica fue agua, por lo que se corrió un blanco para eliminar las interferencias dadas por la presencia de caseína residual y ácido tricloroacético en las muestras, la corrección de absorbancias se puede observar en los cuadros 26-32. A partir de los datos obtenidos del estándar y las absorbancias corregidas por el blanco se realizó un análisis de regresión lineal para obtener las actividades enzimáticas de las muestras, los resultados de todas las actividades enzimáticas obtenidas de las muestras se observan en los cuadros 34 al 39 en unidades por mL de solución, que posteriormente se pasaron a unidades por gramo de muestra utilizando las diluciones realizadas y los pesos de muestra, en los cuadros 40 al 46; puede observarse que existe similitud en los resultados de actividad enzimática obtenidos de todos los precipitados; para determinar si existe una diferencia significativa entre las tres muestras se realizó un análisis ANOVA en conjunto con un análisis post hoc de comparación multiple Tukey con un nivel de significancia del 95%, dado a que al realizar el análisis ANOVA únicamente se indica que existe diferencia significativa entre las medias de las 3 muestras; sin embargo, no indica cual de todas es diferente, al realizar el análisis tukey, se puede observar en el cuadro 3 que existen diferencias significativas entre los 3 grupos, dado a que el valor de P obtenido por las 3 muestras es menor al nivel de significancia establecido como 0.05. Lo cual establece que, para las 3 muestras de papaína precipitada, se obtuvo una mejor actividad enzimática por gramo de material en las semillas de papaya comparándolo contra la fruta como para la cáscara. Se realizó el mismo análisis post hoc tukey para las muestras de crudos, los resultados se observan en el cuadro 4, y se determinó que de la misma forma que para los precipitados, existen diferencias significativas entre las 3 muestras analizadas, demostrando ser las semillas de papaya superiores en actividad enzimática comparándolas contra utilizar cáscara o el fruto. La fuente de papaína de las papayas viene dentro del látex del producto, al realizar los lavados de papaya en el proceso de corte y transporte, se elimina esta fuente de papaína de la fruta como de la cáscara en una alta

proporción. A diferencia de estas, la semilla contiene una alta concentración de papaína dentro de su interior ya que estas facilitan la germinación al descomponer las proteínas de las semillas (Villavicencio, 2011).

Los resultados del cuadro 2, muestran las 3 pruebas T realizadas para indicar si existe una diferencia significativa entre las medias de las muestras crudas contra las muestras precipitadas, con una significancia del 95%, se determinó que para todas las muestras es factible precipitar las enzimas, dado a que la diferencia entre la actividad enzimática es significativa como para considerar la precipitación como opción para obtener una mejor actividad enzimática por gramo de material; sin embargo, al analizar los balances de masa descritos por las figuras 12 al 14, se observa que la cantidad extraída del precipitado de los extractos es apenas entre 2% a 3% (m/m) en promedio la cantidad obtenida de las muestras crudas, por lo que para analizar si la precipitación vale la pena en un nivel mayor a la escala de laboratorio, deben considerarse las cantidades de etanol, agua y energía utilizados para precipitar las muestras, así como el comparativo de la actividad enzimática respecto al estándar obtenido en las muestras crudas de fruto, cáscara y semillas, ya que en estos casos el volumen es un factor importante, a pesar de obtener una actividad enzimática menor, el volumen es significativamente mayor para poder obtener una mayor cantidad de papaína.

Las actividades enzimáticas obtenidas por las muestras se compararon contra las actividades obtenidas por los estándares de pastillas de papaína, se puede observar en los cuadros 5 y 6 los comparativos contra el estándar promedio obtenidos de las muestras, entre las muestras crudas, se puede observar que la muestra que obtuvo un mayor porcentaje de actividad enzimática respecto al estándar, fueron las semillas con una proporción de 0.16874, mientras que la cáscara obtuvo el menor de los comparativos respecto al estándar, obteniendo únicamente una proporción de 0.02107, se infiere que es esta diferencia de actividad enzimática es provocado por la eliminación del látex en la parte externa del fruto al momento de realizar el lavado de papaya a nivel industrial, así como los cortes y el proceso de eliminación de semillas; dado a que en este proceso, tanto las semillas como los líquidos remanentes de las frutas quedan en el mismo lugar, las semillas pueden absorber parte de esta

agua con alta concentración de látex, causando que estas tanto como el extracto obtenido de estas tengan una concentración más alta de actividad.

Esto se ve respaldado por el cuadro 6, dado a que, de la misma forma, la actividad enzimática obtenida por el precipitado de semillas fue de 0.51881; no obstante, al analizar las otras fuentes de papaína, se observa que la fruta obtuvo un menor porcentaje de actividad enzimática respecto al estándar, siendo este de 0.47653, comparado contra los 0.48791 de la fruta. Se atribuye esta diferencia a que, la fruta por estar compuesta en su 91% (m/m) por agua tiende a degradarse con una mayor facilidad que las semillas o que la cáscara, por lo que cuando esta se precipita, el precipitado obtenido es mayormente proteínas propias del fruto más que papaína activa.

Al observar los comparativos de actividad enzimática obtenidos tanto del crudo como de los precipitados, se observa una diferencia significativa entre estos y el punto de comparación que en este caso, se toma como 100% la actividad enzimática promedio detectada para las pastillas de papaína, el mayor comparativo respecto al estándar obtenido fue el del precipitado de semillas, que es apenas el 50% de la actividad enzimática de una pastilla comercial. Esto viene derivado a que el precipitado obtenido por las muestras tiene una alta cantidad de contaminantes y otras proteínas y enzimas que no son significativas en la medición de actividad enzimática, además de esto, la naturaleza del proceso industrial que mantiene almacenadas a altas temperaturas las frutas durante mucho tiempo hasta utilizarse, causa que muchas de las enzimas se desactiven a pesar de que estas precipitan, no serán utilizables para su función proteolítica; la papaína además, es una enzima que es desactivada por agentes oxidantes, como yodo, bromo y el oxígeno atmosférico, por lo que se infiere que el almacenamiento a altas temperaturas y el tiempo que esta permanece sin utilizarse, desactiva las enzimas, esto sumado a la cantidad de tiempo que transcurre desde la recolección y almacenamiento de la merma hasta el momento de la selección de muestras fue incierto y pudo ser significativo en la reducción de la actividad enzimática obtenida, además se puede observar que la cáscara de papaya tiene el comparativo respecto al estándar de actividad enzimática más bajo de todas las muestras crudas, ya que esta se encuentra en constante contacto con el oxígeno atmosférico y esta únicamente obtuvo una proporción del

0.02107, mientras que el extracto obtenido de esta obtuvo una proporción comparativa mayor debido a que la enzima está en solución acuosa y no está en contacto con el oxígeno atmosférico.

Al analizar los resultados de los cuadros 5 y 6 y los balances de masa propuestos para un volumen de producción similar al de una aplicación industrial, se puede inferir que la aplicación más factible es el aprovechamiento de los residuos de semilla crudos, principalmente porque este producto crudo obtiene un comparativo contra el estándar promedio de 0.16874, a pesar de que esta no es significativa al compararse a la actividad enzimática de un producto comercial de consumo humano, el volumen de producción permite que este sea aplicable en otras áreas como en el tratamiento de aguas de la empresa, para tratar proteínas, generando valor a los residuos de papaya y mejorando la eficiencia de otros procesos, aunque se debe tomar en cuenta la energía utilizada por un secador de vacío para poder eliminar la humedad de las muestras, ya que al tratarse de grandes volúmenes, la energía utilizada por la bomba de vacío en un equipo capaz de procesar esa cantidad de materia, sería bastante considerable, escalando todas las proporciones de humedad, materia y tiempo de uso, un secador al vacío podría llegar a utilizar 272,524.49 kJ para reducir las humedades a los valores obtenidos a nivel de laboratorio.

Precipitar enzimas de semillas de papaya a nivel de laboratorio es factible dado a que se trabaja a escala, sin embargo, el balance de masa y energía de las figuras 12, 13 y 14 muestra que para el secado al vacío que permita eliminar el agua de una cantidad de 21 kg de muestra, se requeriría 17,640.931 kJ, tomando en cuenta que para considerar la precipitación de esta se utilizaría una cantidad de 290.39 kg de etanol, los costos de producción aumentarían haciendo que el proceso no sea factible a una escala fuera del laboratorio, a pesar de que parte del etanol pueda ser recuperado, posteriormente. Requeriría de una alta inversión de equipos e investigación posteriores para el refinamiento del producto y la recuperación del solvente utilizado.

IX. Conclusiones

- Se comparó la actividad enzimática de la papaína obtenida por las muestras crudas de cáscara, fruta y semillas siendo estas de $11,404.377 \pm 418.480$, $45,999.284 \pm 1944.804$ y 91348.019 ± 1472.609 unidades USP por gramo de material, respectivamente. Mientras que la actividad enzimática de la papaína obtenida por las muestras precipitadas de cáscara, fruta y semillas fueron de $264,129.317 \pm 2671.277$, $257,410.087 \pm 2788.887$ y $280,860.202 \pm 3386.887$ unidades USP por gramo de material, respectivamente. Por medio de un análisis post hoc tukey, con un nivel de significancia del 95% se determinó que existen diferencias significativas entre las muestras crudas de fruta y cáscara, cáscara y semilla, siendo la muestra de semillas significativamente mayor que las otras, de manera similar, se determinó que existen diferencias significativas entre las muestras precipitadas de fruta y cáscara, cáscara y semilla, siendo la muestra de semillas significativamente mayor que las otras, esto derivado al grado de contaminación de las muestras por tratarse de una merma de producción.
- Se realizó una prueba T de student con un intervalo de confianza al 95% para determinar si existe diferencia significativa entre las muestras precipitadas y las muestras crudas, se determinó que existen diferencias significativas entre la actividad enzimática de las tres muestras precipitadas por lo tanto para obtener una actividad enzimática por gramo mayor se debe realizar una precipitación utilizando el extracto de las materias primas.
- Al comparar las muestras crudas contra un producto comercial de papaína se obtuvo únicamente el 2.107%, 8.497% y 16.874% de la actividad enzimática de una pastilla comercial de papaína, para las muestras de cáscara, fruta y semillas respectivamente. Después de realizarse la precipitación y centrifugación de papaína por medio del método de precipitación alcohólica, mejoró la actividad enzimática al compararse contra un producto comercial, obteniendo 48.791%, 47.653% y 51.881% de la actividad enzimática de una pastilla comercial de papaína.

X. Recomendaciones

- Realizar un modelo experimental que contemple precipitación por medio de adición de otros solventes o por precipitación isoeléctrica, debido a que permite determinar el método más adecuado para conseguir la mayor cantidad de enzimas, es esencial también tomar en cuenta otros factores como el tiempo de experimentación, facilidad de conseguir reactivos y el rendimiento de precipitación de enzimas.
- Realizar un ensayo de secado de muestras a altas temperaturas, esto debido a que el secado al vacío es un método que toma mucho tiempo de experimentación, además, no permite el secado de varias muestras a la vez, lo que implica realizar el mismo procedimiento para cada una de las muestras. El ensayo de secado a alta temperatura permite determinar la pérdida de actividad enzimática por la temperatura y el tiempo de secado, lo que a su vez puede indicar si la pérdida de actividad enzimática compensa el tiempo ahorrado en el secado de muestras.
- Realizar un ensayo únicamente utilizando los lixiviados procedentes del corte, procesamiento y lavado de papaya a nivel industrial, debido a que permite determinar la cantidad de papaína perdida en el lavado de la papaya y evaluar si usar el lixiviado es factible para la extracción de papaína.
- Realizar un ensayo utilizando el látex de papaya, tomado como muestras papayas que solamente hayan pasado por el corte y no por el lavado, ya que el látex se pierde en el lavado de papaya a nivel industrial y este es de donde sale la mayor cantidad de enzimas.
- Analizar costo-beneficio de la extracción y purificación de enzimas, para determinar si es posible una replicación a nivel industrial que deje un beneficio económico.
- Analizar el desarrollo de un modelo de precipitación en función del tiempo, analizando espectrofotométricamente, una muestra en un rango de tiempo establecido como 1

hora, de esta forma se determina el tiempo máximo de obtención de papaína precipitada en el proceso.

- Realizar una caracterización del precipitado obtenido de papaína, establecer métodos de separación específicos para papaína, de forma que se aumente la pureza del precipitado.

XI. Referencias

- Arana, P., y Quijano, M. (2012). Extracción, caracterización y comparación de látex obtenido en secado por aspersión, de variedades de papaya (*Carica papaya* L.). *Escuela Superior Politécnica del Litoral*. Escuela Superior Politécnica del Litoral.
- Bermeo Berrones, J. G. Salgado Tello, I. P., Flores Mancheno, C. I., y Sánchez Herrera, T. E. (2020). *Evaluación da la actividad de tres enzimas proteolíticas como biocatalizadores lácteos*. *ConcienciaDigital*, 3(2.1), 162-176. <https://doi.org/10.33262/concienciadigital.v3i2.1.1231>
- Bindi, M. (2010). *Extraction of papain enzymes from papaya leaves*. Universidad de Pahang. Malasia.
- Camargo, G. (1996). *Factibilidad técnico-económica para la producción de papaína en Colombia*. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Castillo, W; Zavaleta, J; Sánchez, L; Bustamante, S; (2022). *Papaya (Carica papaya) mínimamente procesada fortificada con calcio por impregnación al vacío*. Universidad Cesar Vallejo, Perú. PP. 7.
- Carrera, J. (2003). *Producción y Aplicación de Enzimas Industriales, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ingeniería Agroindustrial*. Universidad del Cauca, Popayán, Grupo de investigación. Vol 1.
- CUPER, O. (1965). *Deshidratación Artificial – Liofilización Alimentaria. Tomo 1: Bases Generales*. Tecnología Industrial. Buenos Aires, Consejo Nacional de Desarrollo, Grupo de Proyectos Especiales.
- Díaz Aliaga, J. K. (2019). *Aplicación de la Enzima Papaina Obtenida a Partir de las Semillas CARICA Papaya como Coagulante Natural para la Remoción de Turbidez en la PTAR- V.E.S.*
- Fernández, J. (2005). *Plan de negocios para la producción de papaína en la séptima región*. Universidad de Talca, Chile.
- Gómez, L; (2019). *Mejoramiento de los parámetros en la elaboración de una bebida fermentada de sorgo similar cerveza*. Extraído de: https://www.researchgate.net/publication/337618665_Mejoramiento_de_los_Parametros_en_la_Elaboracion_de_una_Bebida_Fermentada_de_Sorgo_Simil_Cerveza

- Gutierrez, M; Geraldine, S; Velásquez, S. Virginia, E. y Ferrer, J. (2009). *Determinación del efecto de maduración de la lechosa (Carica papaya L.) sobre la concentración de papaína*. Venezuela. 16 PP.
- Jimenez, J. (2002). *Manual práctico para el cultivo de la papaya hawaiana*. 1era ED. Costa Rica. Ed. EARTH. PP
- Lin, N. M., Linn, K. S., Than, Y. M., y Thu, M. K. (2020). *Estudios enzimáticos sobre la papaína cruda de las cáscaras de papaya*. Maubin University Research Journal, 11, 173-180
- MAGA, (2014). *Perfil comercial de papaya en Guatemala*. Guatemala, Extraído de: precios.maga.gob.gt/archivos/perfiles/Perfil%20Papaya.pdf
- Martines, E; (2014). *Desarrollo de un sistema de secado al vacío para medición de contenido de humedad*. Simposio de metrología. Querétaro, México. PP. 6-10
- Nitsawang, S. Hatti-Kaul, R. Kanasawuda (2006). *Purificación de papaína a partir de látex de Carica papaya: Extracción acuosa en dos fases vs. precipitación salina en dos etapas*. *Tecnología enzimática y microbiana*. 39, 1103-1107.
- Parzanese, M; (S.F.); *Tecnologías para la Industria Alimentaria Liofilización de alimentos*. Buenos aires, Argentina. Extraído de: https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar/contenido/sectores/tecnologia/Ficha_03_Liofilizados.pdf
- Perera, H; Yanovsky J. (1996). *Proyecto LIAL – Liofilización Alimentaria*. Buenos Aires.
- Quintero, V; Celis, J; (2009). *Evaluación de la papaína sobre el pelambre en el proceso de transformación del cuero*. Universidad La Gran Colombia. PP 169-192.
- Ramirez, F. (2019). *La papaína y su potencial como producto de valor agregado en Costa Rica*. Extraído de: https://www.researchgate.net/publication/332738556_La_papaina_y_su_potencial_como_producto_de_valor_agregado_en_Costa_Papain_and_its_potential_as_a_value-added_product_in_Costa_Rica
- Ramirez, J. (2006). *Liofilización, Estado del Arte*. Universidad del Valle Programa Doctoral en Ingeniería. Ingeniería de Alimentos. Cali, Colombia.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., Thomas, P.D., Huang, X., Bateman, A. y Finn, R.D. (2018) *Base de datos MEROPS de enzimas proteolíticas, sus sustratos e inhibidores en*

- 2017 y una comparación con las peptidasas de la base de datos PANTHER. *Nucleic Acids Res* 46, D624-D632.
- Rivera, R; Oliva, S; Tinco, D; (2023). *Extracción y purificación de papaína obtenida a partir de tres especies nativas del género Vasconcellea*. *Rev. Investigación Altoandín*. V. 25. Extraído de: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2313-29572023000200109
- Roe, S (2001). *Técnicas de purificación de proteínas* (2da edición) New York, USA. Oxford University Press.
- Rodríguez, D; Umaña, F (1995). *Extracción y caracterización de papaína*. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Rodríguez, A. (2008). *Desarrollo de un proceso para la extracción de papaína en Colombia*. Universidad de los Andes. Bogotá, Colombia.
- Rojas-Mandujano, V, González, K, Hernández, C, O’Farrill, P, Rivero, Herrera, D. (2018). *Síndrome látex-papaya: una asociación poco frecuente*. *Revista alergia México*, 65(1), 3-9.
- Salunkhe, D.K. y Kadam S. (1995). *Manual de ciencia y tecnología de frutas, producción, composición, almacenamiento y procesamiento*. USA. Taylor y Francis Ltd
- Sánchez, S; Méndez, M; (2020). *Estructura y propiedades de proteínas. Parte I. Extracción y precipitación por salado*. Extraído de: <https://docplayer.es/180992387-Estructura-y-propiedades-de-proteinas-parte-i-extraccion-y-precipitacion-por-salado-q-a-moises-mendez-ramirez-dra-sobeida-sanchez-nieto.html>
- Sigma Quality, *Ensayo enzimático de proteasa, caseína como sustrato*. Extraído de: [Subtilisin A \(P5380\) - Enzyme Assay \(sigmaaldrich.com\)](https://www.sigmaaldrich.com)
- Shodex, Resonac. (2023). *Papaina, IEC SP-825 Retention times*, Extraído de: <https://www.shodex.com/en/dc/01/04/32.html>
- Starley, F; Mohammed, P; Shneider, G; Bickler, S. (1999). *El tratamiento de quemaduras pediátricas con papaya tropical*. *Burns*. 25 636-639.
- Theppakorn, T; Ploysri, K; (2014), *Desarrollo de un kit de prueba visual para la estimación de polifenoles totales en el té*. *International Food Research Journal* 21(2) PP. 501-506

Tineo, D., Bustamante, D. E., Calderon, M. S., Mendoza, J. E., Huaman, E., y Oliva, M. (2020). *Un enfoque integrador revela cinco nuevas especies de papayas de altura (Caricaceae, Vasconcellea) del norte del Perú*. PLoS ONE, 15(12 December). 10.1371/journal.pone.0242469

Tébar, (2009). *Bioquímica estructural tema 2 – Proteínas: Definición, concepto y significación biológica*. Aminoácidos, sus clases y propiedades generales.

Tovar-Colmenárez, Y., Ávila de Hernández, R., Pire-Sierra, M. C., y Gonzáles-Ortíz, M. T. (2018). *Purificación de la papaína del látex de la lechosa y cuantificación de la actividad enzimática*. Revista Científica A.S.A, August, 44-59.

USP 29; (2010). *Monografía de Papaína*. Biologics and Biotechnology – Proteíns and Polysaccharides. USP 29-NF24- PP. 1634.

Vidal, L; Finot, V, Mora, K. Venegas, F. (2009). *Características fisicoquímicas del látex de papayuelo (Vasconcellea cundinamarcensis, Badillo Caricaceae) Chile*; PP 11.

Villavicencio, C; (2011). *Extracción, concentración y cuantificación de la actividad enzimática de papaína a partir de la papaya*. Universidad técnica de Ambato. Ambato, Ecuador. PP. 80

Xianxuan Z; Timothy, R; Xu, Y; Sheng, L; Liu, J (2012). *Síntesis quimioenzimática de heparán sulfato y heparina*. Biocatálisis y biotransformación. 30:3, PP. 296-308.

XII. Anexos

A. Datos originales

Cuadro 6.

Humedades muestras crudas secas y húmedas medido con Balanza Ohaus MB45

MUESTRA	% (m/m) HUMEDAD (±0.01%)	% (m/m) PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
PSS (1)	3.24		
PSS (2)	3.13		
PSS (3)	3.25		
PSS (4)	3.18	3.2000	0.000560
PSH (1)	25.65		
PSH (2)	26.91		
PSH (3)	26.52		
PSH (4)	27.38	26.6150	0.007331
CS (1)	1.41		
CS (2)	1.92		
CS (3)	1.75		
CS (4)	2.15	1.8075	0.003116
CH (1)	35.32		
CH (2)	34.64		
CH (3)	35.18		
CH (4)	34.26	34.8500	0.004906
FS (1)	2.25		
FS (2)	1.94		
FS (3)	2.12		
FS (4)	2.03	2.0850	0.001323
FH (1)	54.81		
FH (2)	58.80		
FH (3)	57.23		
FH (4)	57.33	57.0425	0.016523

PSS: pasta de semillas seca; PSH: pasta de semillas húmeda; CS: cáscara seca; CH: cáscara húmeda; FS: fruto seco; FH: fruto húmedo. % de humedad relativa, medido por medio de balanza de humedad Ohaus MB 45 con ciclo de secado 100°C por 10 minutos.

Cuadro 7.

Pesos de muestra papaína precipitada para soluciones

MUESTRA	% (m/m) HUMEDAD (±0.01%)	% (m/m) PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
PSSP (1)	1.23		
PSSP (2)	1.20		
PSSP (3)	1.16		
PSSP (4)	1.18	1.1925	0.000299
PSHP (1)	40.25		
PSHP (2)	40.82		
PSHP (3)	41.07		
PSHP (4)	40.94	40.7700	0.003614
CPS (1)	1.54		
CPS (2)	1.48		
CPS (3)	1.52		
CPS (4)	1.51	1.5125	0.000250
CPH (1)	42.25		
CPH (2)	41.64		
CPH (3)	42.18		
CPH (4)	42.26	42.0825	0.002971
FPS (1)	1.26		
FPS (2)	1.37		
FPS (3)	1.28		
FPS (4)	1.31	1.3050	0.000480
FPH (1)	44.51		
FPH (2)	44.81		
FPH (3)	45.13		
FPH (4)	44.25	44.6750	0.003800

PSSP: pasta de semillas seca precipitada; PSHP: pasta de semillas húmeda precipitada; CPS: cáscara precipitada seca; CPH: cáscara precipitada húmeda; FPS: fruto precipitado seco; FPH: fruto precipitado húmedo. % de humedad relativa, medido por medio de balanza de humedad Ohaus MB 45 con ciclo de secado 100°C por 10 minutos.

Cuadro 8.

Pesos de muestra cruda para soluciones

MUESTRA	PESO (± 0.05 g)
CCL (1)	0.552
CCL (2)	0.535
CCL (3)	0.541
CCL (4)	0.521
FCL (1)	0.514
FCL (2)	0.516
FCL (3)	0.518
FCL (4)	0.512
SCL (1)	0.519
SCL (2)	0.522
SCL (3)	0.525
SCL (4)	0.518

CCL: cascara cruda liofilizada; FCL: fruto crudo liofilizado; SCL: semilla cruda liofilizada en condiciones de vacío a $> -50^{\circ}\text{C}$ Liofilizador Labconco Freezone 4.5

Cuadro 9.

Pesos de muestra papaína precipitada para soluciones

MUESTRA	PESO (± 0.05 g)
PCL (1)	0.150
PCL (2)	0.146
PCL (3)	0.148
PCL (4)	0.152
PFL (1)	0.142
PFL (2)	0.149
PFL (3)	0.151
PFL (4)	0.152
PSL (1)	0.149
PSL (2)	0.152
PSL (3)	0.145
PSL (4)	0.148

PCL: precipitado de cáscara liofilizada; PFL: precipitado de fruto liofilizado; SCL: semilla cruda liofilizada en condiciones de vacío a $> -50^{\circ}\text{C}$ Liofilizador Labconco Freezone 4.5.

Cuadro 10.

Pesos de tabletas papaína (producto comercial concentración 100,000 U USP/tableta para solución madre)

MUESTRA	PESO (± 0.05 g)
MX1	0.659
MX2	0.658
MX3	0.663
MX4	0.660
MX5	0.660
MX6	0.655
MX7	0.662
MX8	0.659
MX9	0.658
MX10	0.661

Cuadro 11.

Peso promedio tomado (tableta macerada para solución madre de STD)

MUESTRA	PESO (± 0.05 g)
STD 1	0.665

Cuadro 12.

Peso de tubos centrífuga para precipitado de fruto de papaya

TUBO	PESO (± 0.05 g)
T1	20.708
T2	20.751
T3	20.707
T4	20.772
T5	20.701
T6	20.729
T7	20.701
T8	20.739
T9	20.774
T10	20.717
T11	20.728
T12	20.769

Cuadro 13.

Peso de tubos centrífuga para precipitado de cáscara de papaya

TUBO	PESO ((±0.05 g)
T1	57.564
T2	57.546
T3	57.516
T4	57.559

Cuadro 14.

Peso de tubos centrífuga para precipitado de semillas de papaya

TUBO	PESO ((±0.05 g)
T1	57.576
T2	57.533
T3	57.585
T4	57.585

Cuadro 15.

Absorbancias de solución 0.515 g/100 mL (fruto crudo liofilizado)

MUESTRA	ABS (1) ± 0.005	ABS (2) ± 0.005	ABS (3) ± 0.005	ABS (4) ± 0.005	ABS (5) ± 0.005	PROMEDIO	DESVEST
MX1	0.434	0.439	0.442	0.44	0.448	0.441	0.005
MX2	0.43	0.428	0.427	0.428	0.43	0.429	0.001
MX3	0.405	0.406	0.404	0.404	0.406	0.405	0.001
MX4	0.413	0.415	0.414	0.416	0.414	0.414	0.001

Cuadro 16.

Absorbancias de solución 0.537 g/100 mL (cáscara cruda liofilizada)

MUESTRA	ABS (1) ± 0.005	ABS (2) ± 0.005	ABS (3) ± 0.005	ABS (4) ± 0.005	ABS (5) ± 0.005	PROMEDIO	DES. VEST
MX1	0.269	0.27	0.271	0.272	0.272	0.271	0.001
MX2	0.265	0.264	0.264	0.266	0.266	0.265	0.001
MX3	0.258	0.259	0.26	0.263	0.261	0.260	0.002
MX4	0.26	0.258	0.26	0.262	0.263	0.261	0.002

Cuadro 17.

Absorbancias de solución 0.521 g/100 mL (pasta de semillas cruda liofilizada)

MUESTRA	ABS (1) ± 0.005	ABS (2) ± 0.005	ABS (3) ± 0.005	ABS (4) ± 0.005	ABS (5) ± 0.005	PROMEDIO	DESVEST
MX1	0.552	0.554	0.553	0.554	0.554	0.553	0.001
MX2	0.555	0.554	0.552	0.551	0.554	0.553	0.002
MX3	0.558	0.557	0.555	0.557	0.557	0.557	0.001
MX4	0.556	0.553	0.552	0.553	0.554	0.554	0.002

Cuadro 18.

Absorbancias de solución 0.149 g/100 mL (papaína precipitada extracto de fruto liofilizada)

MUESTRA	ABS (1) ± 0.005	ABS (2) ± 0.005	ABS (3) ± 0.005	ABS (4) ± 0.005	ABS (5) ± 0.005	PROMEDIO	DESVEST
MX1	0.647	0.652	0.648	0.654	0.652	0.651	0.003
MX2	0.627	0.624	0.639	0.637	0.632	0.632	0.006
MX3	0.617	0.612	0.614	0.608	0.613	0.613	0.003
MX4	0.654	0.652	0.654	0.655	0.653	0.654	0.001

Cuadro 19.

Absorbancias de solución 0.149 g/100 mL (papaína precipitada extracto de cáscara liofilizada)

MUESTRA	ABS (1) ± 0.005	ABS (2) ± 0.005	ABS (3) ± 0.005	ABS (4) ± 0.005	ABS (5) ± 0.005	PROMEDIO	DESVEST
MX1	0.562	0.561	0.563	0.561	0.562	0.562	0.001
MX2	0.563	0.566	0.568	0.567	0.567	0.566	0.002
MX3	0.562	0.561	0.567	0.565	0.564	0.564	0.002
MX4	0.562	0.561	0.562	0.564	0.568	0.563	0.003

Cuadro 20.

Absorbancias de solución 0.149 g/100 mL (papaína precipitada extracto de semillas liofilizada)

MUESTRA	ABS (1) ± 0.005	ABS (2) ± 0.005	ABS (3) ± 0.005	ABS (4) ± 0.005	ABS (5) ± 0.005	PROMEDIO	DESVEST
SP1	0.587	0.586	0.587	0.585	0.585	0.586	0.001
SP2	0.582	0.584	0.582	0.581	0.583	0.582	0.001
SP3	0.586	0.583	0.584	0.585	0.585	0.585	0.001
SP4	0.585	0.588	0.586	0.587	0.588	0.587	0.001

Cuadro 21.

Absorbancias de solución blanco

MUESTRA	ABS (1) ± 0.005	ABS (2) ± 0.005	ABS (3) ± 0.005	ABS (4) ± 0.005	ABS (5) ± 0.005	PROMEDIO	DESVEST
B1	0.087	0.092	0.091	0.088	0.085	0.089	0.003
B2	0.082	0.085	0.083	0.087	0.085	0.084	0.002
B3	0.089	0.093	0.092	0.091	0.088	0.091	0.002

Cuadro 22.

Absorbancias (curva de calibración Papáina producto comercial
concentración 100,000 U USP/Tableta)

MUESTRA (g/100 mL)	ABS (1) ± 0.005	ABS (2) ± 0.005	ABS (3) ± 0.005	ABS (4) ± 0.005	ABS (5) ± 0.005	PROMEDIO	DESVEST
ST 2.5	0.315	0.314	0.318	0.316	0.318	0.316	0.002
ST 5	0.383	0.383	0.383	0.382	0.384	0.383	0.001
ST 7.5	0.41	0.412	0.413	0.415	0.415	0.413	0.002
ST 10	0.538	0.543	0.542	0.54	0.542	0.541	0.002
ST 12.5	0.654	0.66	0.663	0.661	0.662	0.660	0.004

B. Cálculos de muestra

Cálculo 1.

Preparación de soluciones 0.05 M y 1N

$$\text{Ec. 1: } (M) * (V) * (PM) = G$$

Donde:

M. = Concentración final de solución (Molar)

V = Volumen de solución final (mL)

Y = Peso molar (g/mol)

Se utilizó este cálculo para preparar las soluciones con concentración 0.05 M utilizada en la medición de la actividad enzimática. (ácido cítrico y fosfato dibásico de sodio), así como soluciones 1N utilizadas para nivelar pH de las soluciones utilizadas (HCl y NaOH).

Ejemplo Ec. 1:

$$\left(0.05 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \text{Na}_2\text{HPO}_4\right) * (0.1 \text{ L}) * \left(141,96 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \text{Na}_2\text{HPO}_4\right) = 0.7098 \text{ g}$$

Cálculo 2.

Preparación Sustrato caseína y ácido tricloroacético

$$\text{Ec. 2: } \frac{P}{V} * 100 = X\% \left(\frac{m}{v}\right)$$

Donde:

P = Peso de reactivo (g)

V = Volumen de solución final (mL)

X% = Porcentaje m/v solución final

Se utilizó este cálculo para preparar las soluciones 1% caseína utilizada como sustrato para la medición de actividad enzimática y 10% de ácido tricloroacético utilizada para frenar la reacción de papaína en la medición de la actividad enzimática.

Ejemplo Ec. 2:

$$\frac{10 \text{ g ácido TCA}}{100 \text{ mL Agua}} * 100 = 10\% \left(\frac{m}{v} \right)$$

Cálculo 3.

Actividad enzimática teórica pastillas de papaína

$$\text{Ec. 3} \quad \frac{(PT*(AC))}{M} = U$$

Donde:

PT = Cantidad de papaína teórica por tableta (mg)

AC = Actividad enzimática teórica papaína (U USP/mg)

M = Masa de pastilla de papaína utilizada (g)

U = Actividad enzimática teórica pastilla de papaína/g (U USP/g)

Se utilizó este cálculo para determinar la actividad enzimática por gramo teórica del estándar de pastillas comerciales de papaína utilizado en la curva de calibración.

Ejemplo Ec. 3:

$$\frac{\left(60 \text{ mg Papaína} * \left(\frac{6000 \text{ U USP}}{1 \text{ mg papaína}} \right) \right)}{0.665 \text{ g/Tab}} = 541,353.383 \text{ U} \frac{\text{USP}}{\text{g}}$$

Cálculo 4.

Soluciones estándar para curva de calibración

$$\text{Ec. 4:} \quad \left(S.M. \frac{U USP}{mL} \right) * \left(\frac{X mL}{Y mL} \right) = \frac{U USP}{mL}$$

Donde:

S.M. = Concentración solución madre 1 tab/100mL

X = mL alícuota del punto de calibración

Y = mL solución final

Se utilizó este cálculo para determinar la actividad enzimática por gramo teórica del estándar de pastillas comerciales de papaína utilizado en la curva de calibración mostrada en la figura 15.

Ejemplo Ec. 4:

$$\left(3600 \frac{U USP}{mL} \right) * \left(\frac{2.5 mL}{100 mL} \right) = 90 \frac{U USP}{mL}$$

Cálculo 5.

Actividad enzimática papaína U USP/mL

$$\text{Ec. 5:} \quad \frac{A-0.1211}{0.0009} = AC. \frac{U}{mL}$$

Dónde:

A = Absorbancia de la muestra

AC = Actividad enzimática U USP/mL

Se utilizó este cálculo para determinar la actividad enzimática por mL de solución de muestra utilizando la curva de calibración y la regresión lineal obtenida de la curva de calibración de la figura 15.

Ejemplo Ec. 5:

$$\frac{0.561 - 0.1211}{0.0009} = 488.778 \frac{U}{mL}$$

Cálculo 6.

Actividad enzimática papaína U/g

$$\text{Ec. 6:} \quad \left(AC \frac{U}{mL} \right) * \left(\frac{Y mL}{M g} \right) = AG \frac{U USP}{g}$$

Dónde:

AC = Actividad enzimática U USP/mL

AG = Actividad enzimática U USP/g

Y = mL de solución de muestra

M = Masa de muestra (g)

Se utilizó este cálculo para determinar la actividad enzimática por g de solución de muestra utilizando la actividad enzimática por mL calculado en el cálculo 7.

Ejemplo Ec. 6:

$$\left(488.788 \frac{U}{mL} \right) * \left(\frac{100 mL}{0.519 g} \right) = 94176.836 \frac{U USP}{g}$$

Cálculo 7.

Comparativa respecto a pastillas estándar

$$\text{Ec. 7: } \frac{AGM}{AGS} * 100 = RC \% \frac{U/g}{U/g}$$

Dónde:

AGM = Actividad enzimática muestra U USP/g

AGS= Actividad enzimática estándar U USP/g

RC = % Rendimiento comparativo respecto a estándar

Se utilizó este cálculo para determinar el porcentaje de la actividad enzimática por g de solución de muestra comparándolo contra la actividad enzimática teórica del estándar.

Ejemplo Ec. 7:

$$\left(\frac{282550.336 \text{ U USP}}{541353.400 \text{ U USP}} \right) * 100 = 52.193\%$$

C. Datos calculados

Cuadro 23.

Absorbancia real curva de calibración papaína producto comercial 360,000

USP/Tableta

MUESTRA	ABS (1) ± 0.005	ABS (2) ± 0.005	ABS (3) ± 0.005	ABS (4) ± 0.005	ABS (5) ± 0.005	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
ST 2.5/100	0.229	0.224	0.229	0.227	0.232	0.228	0.003
ST 5/100	0.297	0.293	0.294	0.293	0.298	0.295	0.002
ST 7.5/100	0.324	0.322	0.324	0.326	0.329	0.325	0.003
ST 10/100	0.452	0.453	0.453	0.451	0.456	0.453	0.002
ST 12.5/100	0.568	0.570	0.574	0.572	0.576	0.572	0.003

Cuadro 24.

Absorbancia real muestras de cáscara cruda liofilizada

MUESTRA	ABS (1)	ABS (2)	ABS (3)	ABS (4)	ABS (5)	PROMEDIO	DESVIACIÓN
	± 0.005	± 0.005	± 0.005	± 0.005	± 0.005		ESTÁNDAR
MX1	0.183	0.180	0.182	0.183	0.186	0.183	0.002
MX2	0.179	0.174	0.175	0.177	0.180	0.177	0.002
MX3	0.172	0.169	0.171	0.174	0.175	0.172	0.002
MX4	0.174	0.168	0.171	0.173	0.177	0.173	0.003

Cuadro 25.

Absorbancia real muestras de semilla cruda liofilizada

MUESTRA	ABS (1)	ABS (2)	ABS (3)	ABS (4)	ABS (5)	PROMEDIO	DESVIACIÓN
	± 0.005	± 0.005	± 0.005	± 0.005	± 0.005		ESTÁNDAR
MX1	0.561	0.562	0.559	0.565	0.566	0.563	0.003
MX2	0.541	0.534	0.550	0.548	0.546	0.544	0.007
MX3	0.531	0.522	0.525	0.519	0.527	0.525	0.005
MX4	0.568	0.562	0.565	0.566	0.567	0.566	0.002

Cuadro 26.

Absorbancia real muestras de fruta cruda liofilizada.

MUESTRA	ABS (1)	ABS (2)	ABS (3)	ABS (4)	ABS (5)	PROMEDIO	DESVIACIÓN
	± 0.005	± 0.005	± 0.005	± 0.005	± 0.005		ESTÁNDAR
MX1	0.348	0.349	0.353	0.351	0.362	0.353	0.006
MX2	0.344	0.338	0.338	0.339	0.344	0.341	0.003
MX3	0.319	0.316	0.315	0.315	0.320	0.317	0.002
MX4	0.327	0.325	0.325	0.327	0.328	0.327	0.001

Cuadro 27.

Absorbancia real muestras de precipitado liofilizado, extracto de cáscara.

MUESTRA	ABS (1)	ABS (2)	ABS (3)	ABS (4)	ABS (5)	PROMEDIO	DESVIACIÓN
	± 0.005	± 0.005	± 0.005	± 0.005	± 0.005		ESTÁNDAR
MX1	0.475	0.469	0.472	0.473	0.477	0.473	0.003
MX2	0.476	0.474	0.477	0.479	0.482	0.478	0.003
MX3	0.475	0.469	0.476	0.477	0.479	0.475	0.004
MX4	0.475	0.469	0.471	0.476	0.483	0.475	0.005

Cuadro 28.

Absorbancia real muestras de precipitado liofilizado, extracto de semilla

MUESTRA	ABS (1)	ABS (2)	ABS (3)	ABS (4)	ABS (5)	PROMEDIO	DESVIACIÓN
	± 0.005	± 0.005	± 0.005	± 0.005	± 0.005		ESTÁNDAR
MX1	0.500	0.494	0.496	0.497	0.5	0.497	0.003
MX2	0.495	0.492	0.491	0.493	0.498	0.494	0.003
MX3	0.499	0.491	0.493	0.497	0.5	0.496	0.004
MX4	0.498	0.496	0.495	0.499	0.503	0.498	0.003

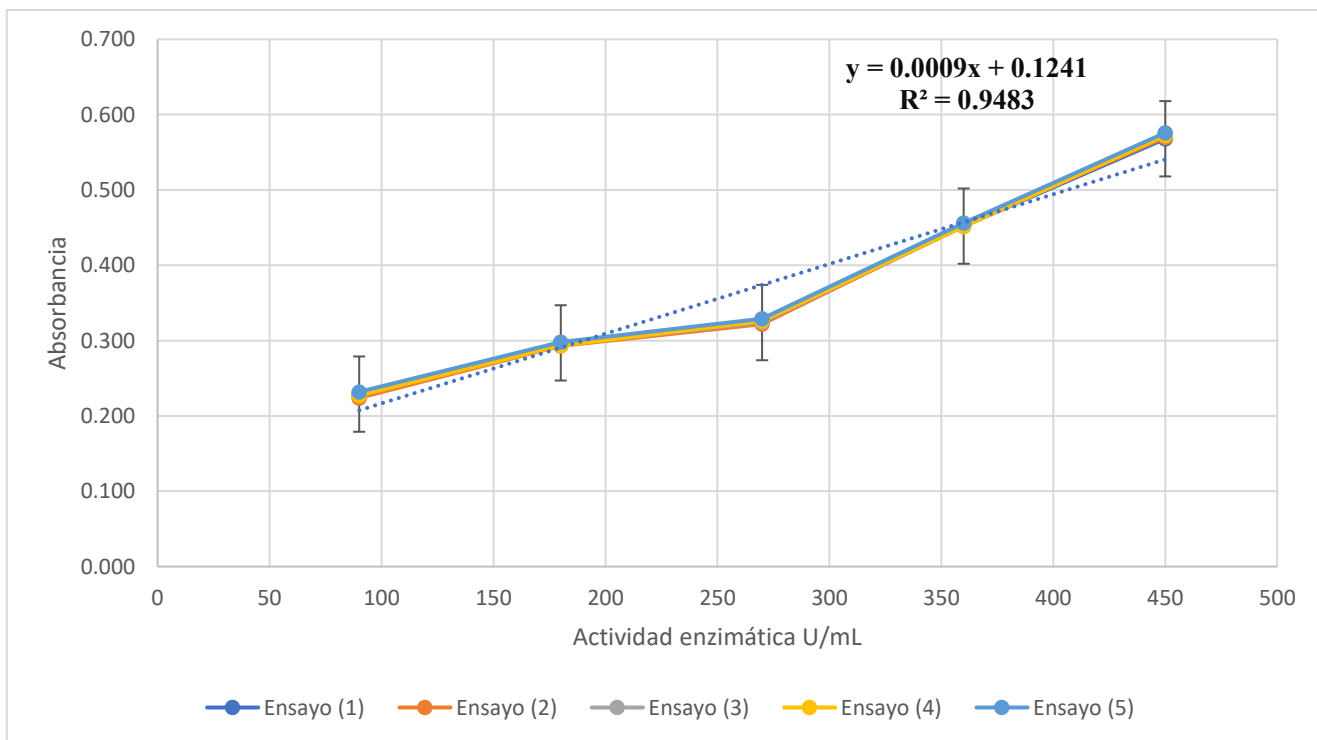
Cuadro 29.

Absorbancia real de extracto de Fruta liofilizada

MUESTRA	ABS (1)	ABS (2)	ABS (3)	ABS (4)	ABS (5)	PROMEDIO	DESVIACIÓN
	± 0.005	± 0.005	± 0.005	± 0.005	± 0.005		ESTÁNDAR
MX1	0.465	0.462	0.462	0.466	0.469	0.465	0.003
MX2	0.468	0.462	0.461	0.463	0.469	0.465	0.004
MX3	0.471	0.465	0.464	0.469	0.472	0.468	0.004
MX4	0.469	0.461	0.461	0.465	0.469	0.465	0.004

Figura 15.

Curva de calibración papaína producto comercial concentración 360,000 U
USP/Tableta



Puntos de calibración de curva tomando 5 diluciones a partir de una solución madre 3600 U USP/mL de papaina comercial estándar. 2.5 mL; 5 mL; 7.5 mL; 10 mL; 12.5 mL de alícuota respectivamente en 100 mL. Tendencia lineal positiva, absorbancia en incremento lineal al aumentar volumen de alícuota del estándar de papaina comercial.

Cuadro 30.

Unidades USP/mL curva de calibración producto comercial

MUESTRA	U/mL (1) ±0.007	U/mL (2) ±0.007	U/mL (3) ±0.007	U/mL (4) ±0.007	U/mL (5) ±0.007	PROMEDIO ±0.007	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
ST 2.5/100	119.889	114.333	120.259	118.037	123.222	119.148	3.271
ST 5/100	195.444	191.000	192.481	191.370	196.556	193.370	2.493
ST 7.5/100	225.444	223.222	225.815	228.037	231.000	226.704	2.947
ST 10/100	367.667	368.778	369.148	366.926	372.111	368.926	1.988
ST 12.5/100	496.556	498.778	503.593	501.370	505.444	501.148	3.577

Cuadro 31.

Unidades USP/mL (fruto crudo liofilizado)

MUESTRA	U/mL (1) ±0.007	U/mL (2) ±0.007	U/mL (3) ±0.007	U/mL (4) ±0.007	U/mL (5) ±0.007	PROMEDIO ±0.007	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
MX1	252.111	253.222	258.037	255.815	267.667	0.183	0.002
MX2	247.667	241.000	241.370	242.481	247.667	0.177	0.002
MX3	219.889	216.556	215.815	215.815	221.000	0.172	0.002
MX4	228.778	226.556	226.926	229.148	229.889	0.173	0.003

Cuadro 32.

Unidades USP/mL (cáscara cruda liofilizada)

MUESTRA	U/mL (1) ±0.007	U/mL (2) ±0.007	U/mL (3) ±0.007	U/mL (4) ±0.007	U/mL (5) ±0.007	PROMEDIO ±0.007	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
MX1	68.778	65.444	68.037	69.148	72.111	0.183	0.002
MX2	64.333	58.778	60.259	62.481	65.444	0.177	0.002
MX3	56.556	53.222	55.815	59.148	59.889	0.172	0.002
MX4	58.778	52.111	55.815	58.037	62.111	0.173	0.003

Cuadro 33.

Unidades USP/mL (pasta de semillas cruda liofilizada)

MUESTRA	U/mL (1) ±0.007	U/mL (2) ±0.007	U/mL (3) ±0.007	U/mL (4) ±0.007	U/mL (5) ±0.007	PROMEDIO ±0.007	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
MX1	488.778	489.889	486.926	493.593	494.333	0.183	0.002
MX2	466.556	458.778	476.926	474.704	472.111	0.177	0.002
MX3	455.444	445.444	449.148	442.481	451.000	0.172	0.002
MX4	496.556	489.889	493.593	494.704	495.444	0.173	0.003

Cuadro 34.

Unidades USP/mL (papaína precipitada extracto de fruto liofilizado)

MUESTRA	U/mL (1) ±0.007	U/mL (2) ±0.007	U/mL (3) ±0.007	U/mL (4) ±0.007	U/mL (5) ±0.007	PROMEDIO ±0.007	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
MX1	382.111	378.778	378.778	383.222	386.556	0.183	0.002
MX2	385.444	378.778	377.667	379.889	386.556	0.177	0.002
MX3	388.778	382.111	381.000	386.556	389.889	0.172	0.002
MX4	386.556	377.667	377.667	382.111	386.556	0.173	0.003

Cuadro 35.

Unidades USP/mL (papaína precipitada extracto de cáscara liofilizado)

MUESTRA	U/mL (1) ±0.007	U/mL (2) ±0.007	U/mL (3) ±0.007	U/mL (4) ±0.007	U/mL (5) ±0.007	PROMEDIO ±0.007	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
MX1	393.222	386.556	389.889	391.000	395.444	0.183	0.002
MX2	394.333	392.111	395.444	397.667	401.000	0.177	0.002
MX3	393.222	386.556	394.333	395.444	397.667	0.172	0.002
MX4	393.222	386.556	388.778	394.333	402.111	0.173	0.003

Cuadro 36.

Unidades USP/mL (papaína precipitada extracto de semillas liofilizado)

MUESTRA	U/mL (1) ±0.007	U/mL (2) ±0.007	U/mL (3) ±0.007	U/mL (4) ±0.007	U/mL (5) ±0.007	PROMEDIO ±0.007	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
MX1	421.000	414.333	416.556	417.667	421.000	0.183	0.002
MX2	415.444	412.111	411.000	413.222	418.778	0.177	0.002
MX3	419.889	411.000	413.222	417.667	421.000	0.172	0.002
MX4	418.778	416.556	415.444	419.889	424.333	0.173	0.003

Cuadro 37.

Unidades USP/g (fruto crudo liofilizado)

MUESTRA	U/g (1)	U/g (2)	U/g (3)	U/g (4)	U/g (5)	PROMEDIO	DESVIACIÓN
	±89.4268	±88.3836	±88.8402	±88.9462	±91.1081		ESTÁNDAR
MX1	49048.854	49265.024	50201.758	49769.419	52075.227	50072.056	1206.166
MX2	47997.416	46705.426	46777.204	46992.535	47997.416	47293.999	650.762
MX3	42449.592	41806.092	41663.092	41663.092	42664.093	42049.192	473.199
MX4	44683.160	44249.132	44321.470	44755.498	44900.174	44581.887	282.951

Cuadro 38.

Unidades USP/g (cáscara cruda liofilizada)

MUESTRA	U/g (1)	U/g (2)	U/g (3)	U/g (4)	U/g (5)	PROMEDIO	DESVIACIÓN
	±21.5469	±19.8928	±20.7956	±21.5686	±22.5074		ESTÁNDAR
MX1	12459.742	11855.878	12325.550	12526.838	13063.607	12446.323	433.277
MX2	12024.922	10986.501	11263.413	11678.782	12232.606	11637.245	517.130
MX3	10453.892	9837.749	10316.971	10933.114	11070.035	10522.352	496.042
MX4	11281.723	10002.133	10713.016	11139.546	11921.518	11011.587	711.594

Cuadro 39.

Unidades USP/g (pasta de semillas cruda liofilizada)

MUESTRA	U/g (1)	U/g (2)	U/g (3)	U/g (4)	U/g (5)	PROMEDIO	DESVIACIÓN
	±175.7503	±173.6117	±175.6827	±175.5964	±176.2690		ESTÁNDAR
MX1	94176.836	94390.923	93820.024	95104.546	95247.270	94547.920	610.554
MX2	89378.459	87888.463	91365.120	90939.407	90442.742	90002.838	1395.253
MX3	86751.323	84846.561	85552.028	84282.187	85904.762	85467.372	953.556
MX4	95860.146	94573.145	95288.145	95502.646	95645.646	95373.945	493.817

Cuadro 40.

Unidades USP/g (papaina precipitada extracto de fruto liofilizado)

MUESTRA	U/g (1)	U/g (2)	U/g (3)	U/g (4)	U/g (5)	PROMEDIO	DESVIACIÓN
	±505.6457	±497.3365	±496.6159	±502.0750	±507.8886		ESTÁNDAR
MX1	269092.332	266744.914	266744.914	269874.804	272222.222	268935.837	2307.963
MX2	258687.547	254213.274	253467.562	254958.986	259433.259	256152.125	2719.550
MX3	257468.727	253053.716	252317.881	255997.057	258204.562	255408.389	2622.300
MX4	254312.865	248464.912	248464.912	251388.889	254312.865	251388.889	2923.977

Cuadro 41.

Unidades USP/g (papaína precipitada extracto de cáscara liofilizado)

MUESTRA	U/g (1)	U/g (2)	U/g (3)	U/g (4)	U/g (5)	PROMEDIO	DESVIACIÓN
	±491.8736	±484.9637	±490.1668	±493.3141	±498.8718		ESTÁNDAR
MX1	262148.148	257703.704	259925.926	260666.667	263629.630	260814.815	2246.778
MX2	270091.324	268569.254	270852.359	272374.429	274657.534	271308.980	2320.845
MX3	265690.691	261186.186	266441.441	267192.192	268693.694	265840.841	2829.046
MX4	258698.830	254312.865	255774.854	259429.825	264546.784	258552.632	3950.075

Cuadro 42.

Unidades USP/g (papaína precipitada extracto de semillas liofilizado)

MUESTRA	U/g (1)	U/g (2)	U/g (3)	U/g (4)	U/g (5)	PROMEDIO	DESVIACIÓN
	±543.5688	±536.6813	±537.4242	±541.4105	±546.8023		ESTÁNDAR
MX1	282550.336	278076.063	279567.487	280313.199	282550.336	280611.484	1944.579
MX2	273318.713	271125.731	270394.737	271856.725	275511.696	272441.520	2028.426
MX3	289578.544	283448.276	284980.843	288045.977	290344.828	287279.693	2967.803
MX4	282957.958	281456.456	280705.706	283708.709	286711.712	283108.108	2338.200

Cuadro 43.

Comparativo de actividad enzimática de cáscara cruda contra STD pastilla

MUESTRA	REND. 1	REND. 2	REND. 3	REND. 4	REND. 5	PROMEDIO	DESVIACIÓN
	±0.0040%	±0.0037%	±0.0038%	±0.0040%	±0.0042%		ESTÁNDAR
MX1	2.302%	2.190%	2.277%	2.314%	2.413%	2.299%	0.001
MX2	2.221%	2.029%	2.081%	2.157%	2.260%	2.150%	0.001
MX3	1.931%	1.817%	1.906%	2.020%	2.045%	1.944%	0.001
MX4	2.084%	1.848%	1.979%	2.058%	2.202%	2.034%	0.001

Cuadro 44.

Comparativo de actividad enzimática de semilla cruda contra STD pastilla

MUESTRA	REND. 1	REND. 2	REND. 3	REND. 4	REND. 5	PROMEDIO	DESVIACIÓN
	±0.0325%	±0.0321%	±0.0325%	±0.0324%	±0.0326%		ESTÁNDAR
MX1	17.397%	17.436%	17.331%	17.568%	17.594%	17.465%	0.001
MX2	16.510%	16.235%	16.877%	16.799%	16.707%	16.626%	0.003
MX3	16.025%	15.673%	15.803%	15.569%	15.869%	15.788%	0.002
MX4	17.707%	17.470%	17.602%	17.641%	17.668%	17.618%	0.001

Cuadro 45.

Comparativo de actividad enzimática de fruta cruda contra STD pastilla

MUESTRA	REND. 1	REND. 2	REND. 3	REND. 4	REND. 5	DESVIACIÓN	
	±0.0165%	±0.0163%	±0.0164%	±0.0164%	±0.0168%	PROMEDIO	ESTÁNDAR
MX1	9.060%	9.100%	9.273%	9.194%	9.619%	9.249%	0.002
MX2	8.866%	8.628%	8.641%	8.681%	8.866%	8.736%	0.001
MX3	7.841%	7.723%	7.696%	7.696%	7.881%	7.767%	0.001
MX4	8.254%	8.174%	8.187%	8.267%	8.294%	8.235%	0.001

Cuadro 46.

Comparativo de actividad enzimática de cáscara precipitada contra STD pastilla

MUESTRA	REND. 1	REND. 2	REND. 3	REND. 4	REND. 5	DESVIACIÓN	
	±0.0909%	±0.0896%	±0.0905%	±0.0911%	±0.0922%	PROMEDIO	ESTÁNDAR
MX1	48.425%	47.604%	48.014%	48.151%	48.698%	48.178%	0.004
MX2	49.892%	49.611%	50.032%	50.314%	50.735%	50.117%	0.004
MX3	49.079%	48.247%	49.218%	49.356%	49.634%	49.107%	0.005
MX4	47.787%	46.977%	47.247%	47.922%	48.868%	47.760%	0.007

Cuadro 47.

Comparativo de actividad enzimática de semilla precipitada contra STD pastilla

MUESTRA	REND. 1	REND. 2	REND. 3	REND. 4	REND. 5	DESVIACIÓN	
	±0.1004%	±0.0991%	±0.0993%	±0.1000%	±0.1010%	PROMEDIO	ESTÁNDAR
MX1	52.193%	51.367%	51.642%	51.780%	52.193%	51.835%	0.004
MX2	50.488%	50.083%	49.948%	50.218%	50.893%	50.326%	0.004
MX3	53.492%	52.359%	52.642%	53.208%	53.633%	53.067%	0.005
MX4	52.269%	51.991%	51.853%	52.407%	52.962%	52.296%	0.004

Cuadro 48.

Comparativo de actividad enzimática de fruta precipitada contra STD pastilla

MUESTRA	REND. 1	REND. 2	REND. 3	REND. 4	REND. 5	PROMEDIO	DESVIACIÓN
	±0.0934%	±0.0919%	±0.0917%	±0.0927%	±0.0938%		ESTÁNDAR
MX1	49.707%	49.274%	49.274%	49.852%	50.285%	49.678%	0.004
MX2	47.785%	46.959%	46.821%	47.097%	47.923%	47.317%	0.005
MX3	47.560%	46.745%	46.609%	47.288%	47.696%	47.180%	0.005
MX4	46.977%	45.897%	45.897%	46.437%	46.977%	46.437%	0.005

Cuadro 49.

Diferencia de comparativo entre precipitado de extracto de cáscara contra cáscara cruda

MUESTRA	DIF. 1	DIF. 2	DIF. 3	DIF. 4	DIF. 5	PROMEDIO	DESVIACIÓN
	±0.0934%	±0.0919%	±0.0917%	±0.0927%	±0.0938%		ESTÁNDAR
MX1	46.123%	45.414%	45.737%	45.837%	46.285%	45.879%	0.003
MX2	47.671%	47.581%	47.952%	48.156%	48.476%	47.967%	0.004
MX3	47.148%	46.430%	47.312%	47.337%	47.589%	47.163%	0.004
MX4	45.703%	45.130%	45.268%	45.865%	46.666%	45.726%	0.006

Cuadro 50.

Diferencia de comparativo entre precipitado de extracto de semilla contra semilla cruda

MUESTRA	DIF. 1	DIF. 2	DIF. 3	DIF. 4	DIF. 5	PROMEDIO	DESVIACIÓN
	±0.0934%	±0.0919%	±0.0917%	±0.0927%	±0.0938%		ESTÁNDAR
MX1	34.797%	33.931%	34.312%	34.212%	34.599%	34.370%	0.003
MX2	33.978%	33.848%	33.071%	33.419%	34.186%	33.700%	0.005
MX3	37.467%	36.686%	36.839%	37.640%	37.765%	37.279%	0.005
MX4	34.561%	34.522%	34.251%	34.766%	35.294%	34.679%	0.004

Cuadro 51.

Diferencia de comparativo entre precipitado de extracto de fruta contra fruta cruda

MUESTRA	DIF. 1	DIF. 2	DIF. 3	DIF. 4	DIF. 5	DESVIACIÓN	
	±0.0934%	±0.0919%	±0.0917%	±0.0927%	±0.0938%	PROMEDIO	ESTÁNDAR
MX1	40.647%	40.173%	40.000%	40.658%	40.666%	40.429%	0.003
MX2	38.919%	38.331%	38.180%	38.416%	39.057%	38.581%	0.004
MX3	39.719%	39.022%	38.913%	39.592%	39.815%	39.412%	0.004
MX4	38.723%	37.723%	37.710%	38.170%	38.683%	38.202%	0.005

Cuadro 52.

Pérdida de humedad por secado para muestras crudas

MUESTRA	% (m/m)	% (m/m)	DESVIACIÓN
	HUMEDAD PERDIDA		
PS (1)	22.41	23.4150	0.007704
PS (2)	23.78		
PS (3)	23.27		
PS (4)	24.20		
C (1)	33.91	33.0425	0.007908
C (2)	32.72		
C (3)	33.43		
C (4)	32.11		
F (1)	52.56	54.958	0.017803
F (2)	56.86		
F (3)	55.11		
F (4)	55.30		

PS: pasta de semillas; C: cáscara de papaya; F: fruto de papaya

Cuadro 53.

Pérdida de humedad por secado para muestras precipitadas

MUESTRA	% (m/m) HUMEDAD PERDIDA	% (m/m) PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
PPS (1)	39.02		
PPS (2)	39.62		
PPS (3)	39.91		
PPS (4)	39.76	39.5775	0.003901
PC (1)	40.71		
PC (2)	40.16		
PC (3)	40.66		
PC (4)	40.75	40.5700	0.002758
PF (1)	43.25		
PF (2)	43.44		
PF (3)	43.85		
PF (4)	42.94	43.3700	0.003806

PSS: precipitado de pasta de semillas; C: precipitado de cáscara de papaya;

F: precipitado de fruto de papaya

Cuadro 54.

Pesos de precipitado y extracto

Muestra	Peso de extracto (g)	Peso agua/etanol (g)	Peso Precipitado (g)	% (m/m) precipitado
Fruto	156.348	142.25	14.098	9.017%
Cáscara	172.185	156.346	15.839	9.199%
Semillas	172.279	155.256	17.023	9.881%

Cuadro 55.

Balance energía secador al vacío precipitado de semillas

Q Materia	Masa (kg)	Cp (kJ/kg*°C)	ΔT	Energía Req. (kJ)
Agua	3.784756433	4.179	10	158.16497
Muestra	21.08619275	3.875	10	817.08997
Evap	3.784756433	2501		9465.6758

Cuadro 56.

Balance de energía de bomba de vacío secador precipitado de semillas

Equipo	P. bomba (kW)	Tiempo uso (h)	Energía Req. (kJ)
Bomba vacío	2	1	7200

Cuadro 57.

Balance de energía de secador al vacío semillas crudas

Q Materia	Masa (kg)	Cp (kJ/kg*°C)	ΔT	Energía Req. (kJ)
Agua	90.64419048	4.217	10	3822.4655
Muestra	387.1201814	3.875	10	15000.907
Evap	90.64419048	2501		226701.12

Cuadro 58.

Balance de energía bomba de vacío semillas crudas

Equipo	P. bomba (kW)	Tiempo uso (h)	Energía Req. (kJ)
Bomba vacío	7.5	1	27000

Cuadro 59.

Balance de energía de secador precipitado de fruta

Q Materia	Masa (kg)	Cp (kJ/kg*°C)	ΔT	Energía Req. (kJ)
Agua	4.2442	4.179	10	177.36509
Muestra	9.7860	3.875	10	379.2085
Evap	4.2442	2501		10614.743

Cuadro 60.

Balance de energía de bomba de vacío precipitado de fruta

Equipo	P. bomba (kW)	Tiempo uso (h)	Energía Req. (kJ)
Bomba vacío	2	1	7200

Cuadro 61.

Balance de energía de secador de fruta cruda

Q Materia	Masa (kg)	Cp (kJ/kg*°C)	ΔT	Energía Req. (kJ)
Agua	238.57676	4.217	10	10060.782
Muestra	434.11138	3.875	10	16821.816
Evap	238.57676	2501		596680.49

Cuadro 62.

Balance de energía de bomba de vacío de fruta cruda

Equipo	P. bomba (kW)	Tiempo uso (h)	Energía Req. (kJ)
Bomba vacío	7.5	1	27000

Cuadro 63.

Balance de energía de secador precipitado de cáscara

Q Materia	Masa (kg)	Cp (kJ/kg*°C)	ΔT	Energía Req. (kJ)
Agua	0.7147447	4.179	10	29.869183
Muestra	1.7617568	3.875	10	68.268077
Evap	0.7147447	2501		1787.5766

Cuadro 64.

Balance de energía de bomba de vacío precipitado de cáscara

Equipo	P. bomba (kW)	Tiempo uso (h)	Energía Req. (kJ)
Bomba vacío	2	1	7200

Cuadro 65.

Balance de energía de secador de cáscara cruda

Q Materia	Masa (kg)	Cp (kJ/kg*°C)	ΔT	Energía Req. (kJ)
Agua	25.313162	4.217	10	1067.4561
Muestra	76.607891	3.875	10	2968.5558
Evap	25.313162	2501		63308.219

Cuadro 66. Balance de energía de bomba de vacío cáscara cruda

Equipo	P. bomba (kW)	Tiempo uso (h)	Energía Req. (kJ)
Bomba vacío	7.5	1	27000

D. Análisis de error**Cálculo 11.**

Incertidumbre para multiplicación y división

$$Sy = y * \sqrt{\left(\frac{Sa}{a}\right)^2 + \left(\frac{Sb}{b}\right)^2}$$

Dónde:

Sy = Incertidumbre del resultado de la operación

y = Resultado de la operación (división o multiplicación)

sa = Incertidumbre del valor de “a”

a = Valor de “a”

sb = Incertidumbre del valor de “b”

b = Valor de “b”

$$Sy = 49048.8543 * \sqrt{\left(\frac{0.007}{252.1111}\right)^2 + \left(\frac{0.001}{0.552}\right)^2} = 88.8673$$

Se realizó el mismo cálculo para todas las incertidumbres requeridas en operaciones que utilizaran multiplicación y división.

Cálculo 12.

Incertidumbre para sumas y restas

$$S_y = \sqrt{(S_a)^2 + (S_b)^2}$$

Donde:

S_y = Incertidumbre del resultado de la operación

s_a = Incertidumbre del valor de “a”

s_b = Incertidumbre del valor de “b”

$$S_y = \sqrt{(0.005)^2 + (0.005)^2} = 0.007$$

Se realizó el mismo cálculo para todas las incertidumbres requeridas en operaciones que utilizaran suma y resta.

E. Especificaciones técnicas de equipos

Figura 16.

Equipo para medición de absorbancias espectrofotómetro shimadzu UV mini 1240 Laboratorio bioprocesos industriales CIT UVG



Cuadro 67.

Especificaciones técnicas espectrofotómetro shimadzu UV mini 1240 laboratorio bioprocesos industriales CIT UVG

DESCRIPCIÓN	ESPECIFICACIÓN
Marca	Shimadzu
Modelo	UV mini 1240
Rango longitud de onda	190 -1100 nm
Exactitud fotométrica	±0.005 Abs
Drift	±0.001 Abs/h
Velocidad escaneo	24-1400 nm/min

Figura 17.

Equipo para medición de humedades Ohaus MB45 laboratorio bioprocesos industriales CIT UVG



Cuadro 68.

Especificaciones técnicas Balanza humedad Ohaus MB45 laboratorio bioprocesos industriales CIT UVG

DESCRIPCIÓN	ESPECIFICACIÓN
Marca	Ohaus
Modelo	MB45
Capacidad máxima	45 g
Legibilidad humedad	$\pm 1\text{mg}/0.01\%$
Repetibilidad	0.015%
Rango temperatura	50-200°C

Figura 18.

Equipo para medición de pesos Balanza Ohaus Pioneer PX163E laboratorio bioprocesos industriales CIT UVG



Cuadro 69.

Especificaciones técnicas Balanza Ohaus Pioneer PX163E laboratorio bioprocesos industriales CIT UVG

DESCRIPCIÓN	ESPECIFICACIÓN
Marca	Ohaus
Modelo	Pioneer PX163E
Lectura mínima	± 0.001 g
Tamaño de plato	120 mm
Linealidad	± 0.002 g
Peso mínimo	0.82 g
Peso máximo	160 g

Figura 19.

Equipo para liofilización de muestras Labconco Freezone 4.5 laboratorio bioprocesos industriales CIT UVG



Cuadro 70.

Especificaciones técnicas Liofilizador Labconco Freezone 4.5 laboratorio bioprocesos industriales CIT UVG

DESCRIPCIÓN	ESPECIFICACIÓN
Marca	Labconco
Modelo	Freezone 4.5
Temperatura congelación	-50°C
Capacidad	2.5 L
Voltaje	115 V
Amperaje	14 A
Frecuencia	60 hz

Figura 20.

Equipo para centrifugación de muestras precipitadas Eppendorf 5804 R laboratorio bioprocesos industriales CIT UVG



Cuadro 71.

Especificaciones técnicas Eppendorf 5804 R laboratorio bioprocesos industriales CIT UVG

DESCRIPCIÓN	ESPECIFICACIÓN
Marca	EPPENDORF
Modelo	5804 R
Rotor	A-4-44
Rango RPM	200-14000
Consumo	1650 W
Temporizador	1-99 MIN
Rotores	8

Figura 21.

Equipo para centrifugación de muestras precipitadas 2 Fischer scientific centrifific model 228 laboratorio bioprocesos industriales CIT UVG



Cuadro 72.

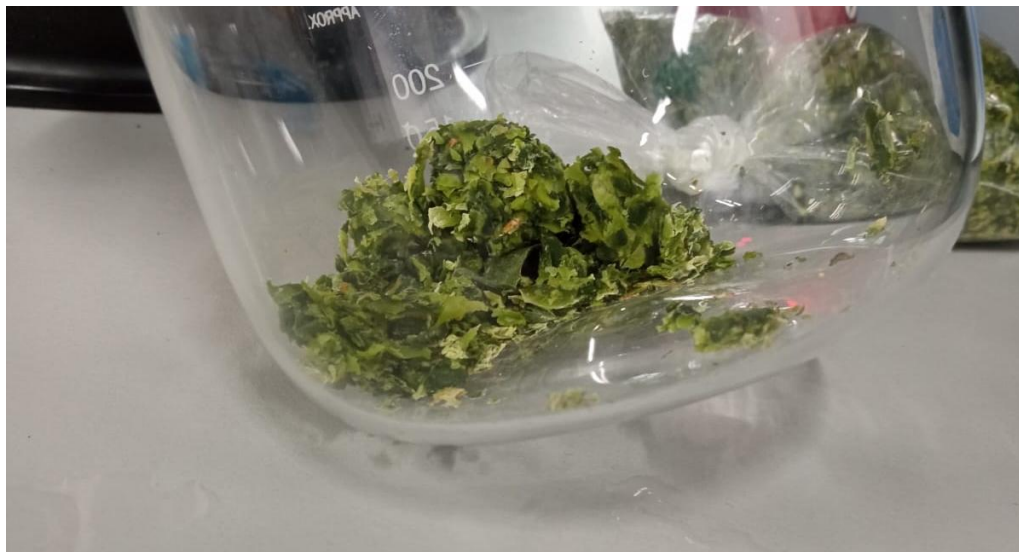
Especificaciones técnicas Fischer scientific centrifific model 228 laboratorio bioprocesos industriales CIT UVG

DESCRIPCIÓN	ESPECIFICACIÓN
Marca	FISCHER SCIENTIFIC
Modelo	228
RPM	3300
Timer	15 min
Tubos	15 mL
Resolución	30 seg

F. Registro gráfico

Figura 22.

Cáscara de papaya previo a liofilizado Laboratorio bioprocesos industriales
CIT UVG



Nota. Elaboración propia.

Figura 23.

Condiciones de liofilización del Liofilizador Labconco Laboratorio
bioprocesos industriales CIT UVG



Nota. Elaboración propia.

Figura 24.

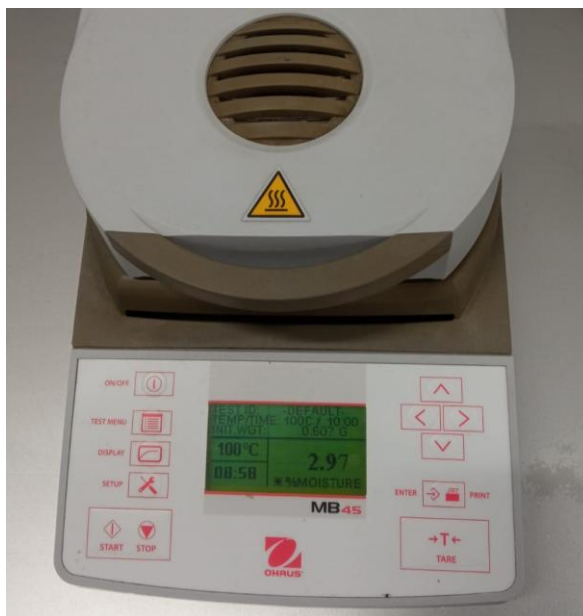
Muestras cáscara de papaya húmeda previa a determinación de humedad
Laboratorio bioprocesos industriales CIT UVG



Nota. Elaboración propia.

Figura 25.

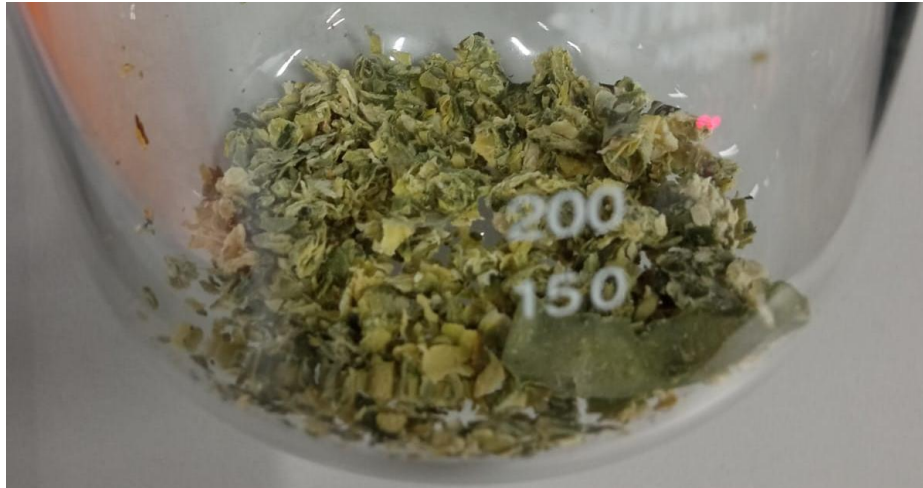
Balanza de humedad, determinación de humedad de fruta cruda liofilizada
Laboratorio bioprocesos industriales CIT UVG



Nota. Elaboración propia.

Figura 26.

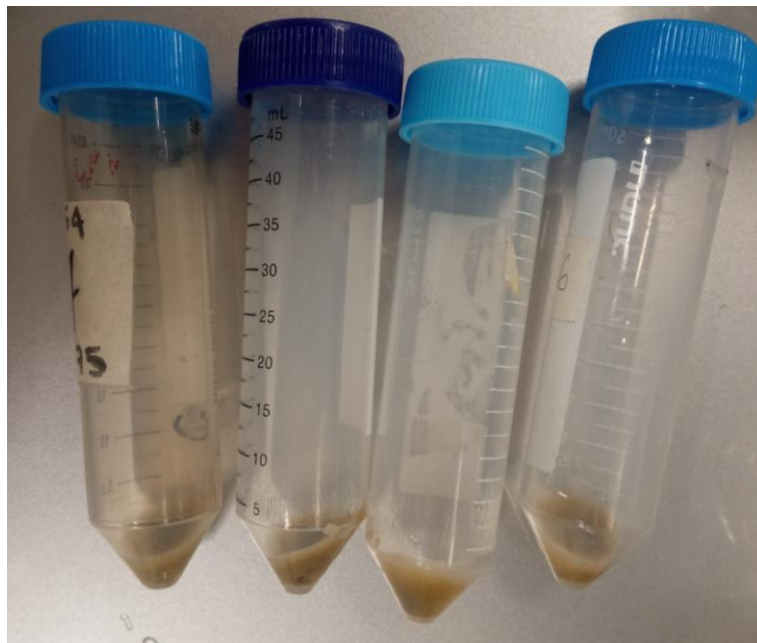
Muestra de cáscara de papaya liofilizada Laboratorio bioprocesos industriales
CIT UVG



Nota. Elaboración propia.

Figura 27.

Precipitado centrifugado semillas de papaya Laboratorio bioprocesos
industriales CIT UVG



Nota. Elaboración propia.

Figura 28.

Precipitado centrifugado Fruto de papaya Laboratorio bioprocesos industriales
CIT UVG



Nota. Elaboración propia.

Figura 29.

Precipitado de cáscara de papaya liofilizado Laboratorio bioprocesos
industriales CIT UVG



Nota. Elaboración propia.

Figura 30.

Pastillas de papaína trituradas usado como estándar Laboratorio bioprocesos industriales CIT UVG

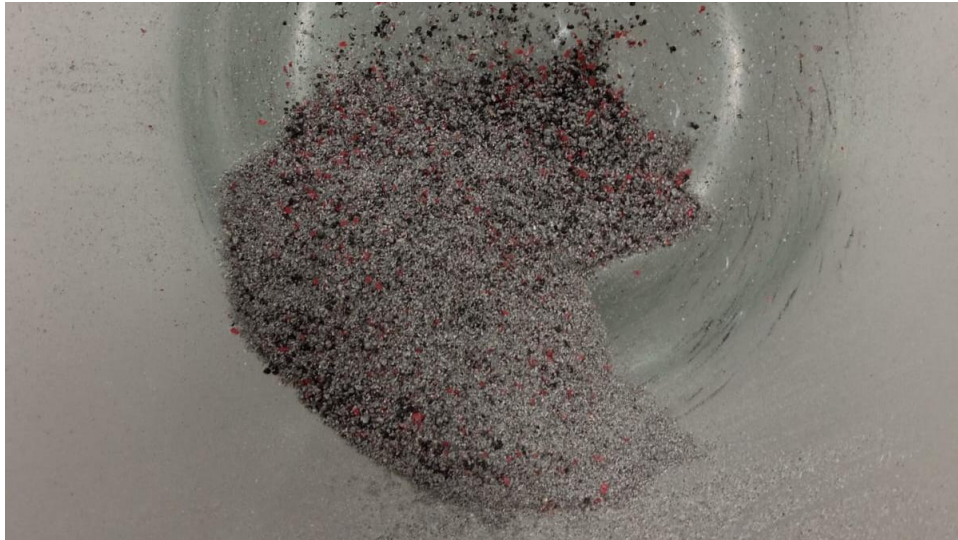
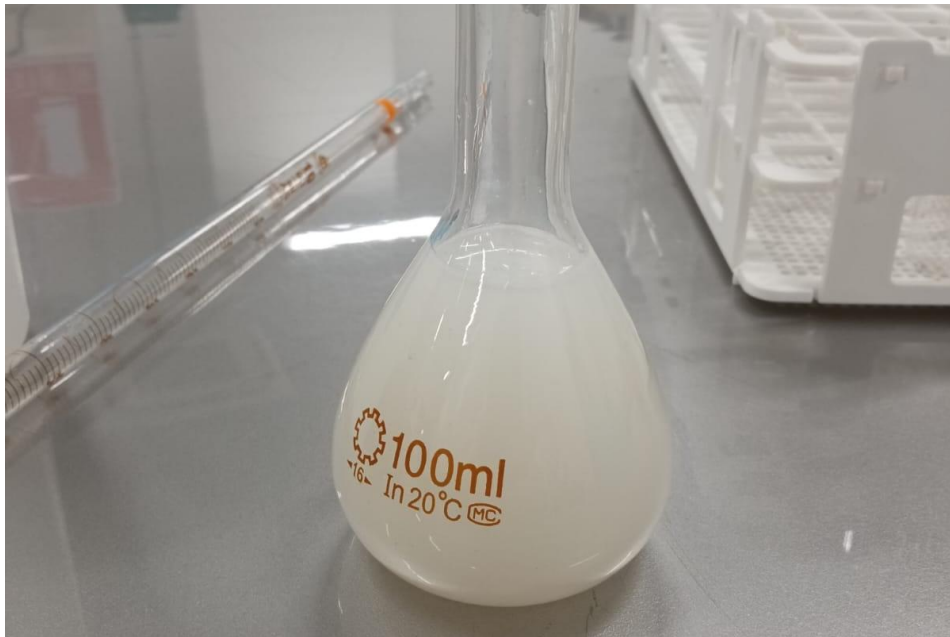


Figura 31.

Sustrato de caseína preparado para actividad enzimática Laboratorio bioprocesos industriales CIT UVG



Nota. Elaboración propia.

Figura 32.

Soluciones de cáscara (fondo izquierdo), fruto, semillas y solución madre de pastillas de papáina Laboratorio bioprocesos industriales CIT UVG



Nota. Elaboración propia.

Figura 33.

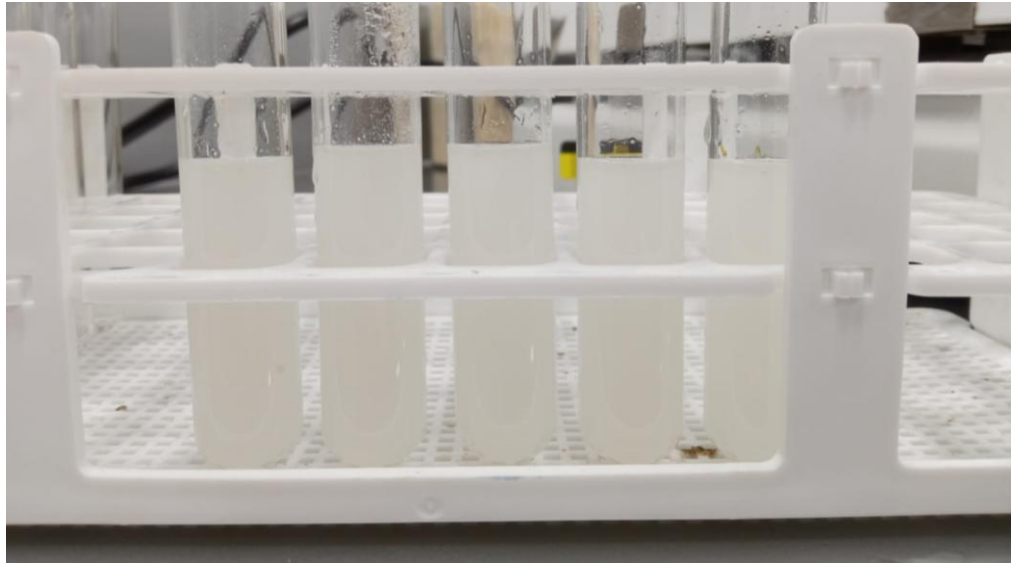
Soluciones de semillas y fruto liofilizadas Laboratorio bioprocesos industriales CIT UVG



Nota. Elaboración propia.

Figura 34.

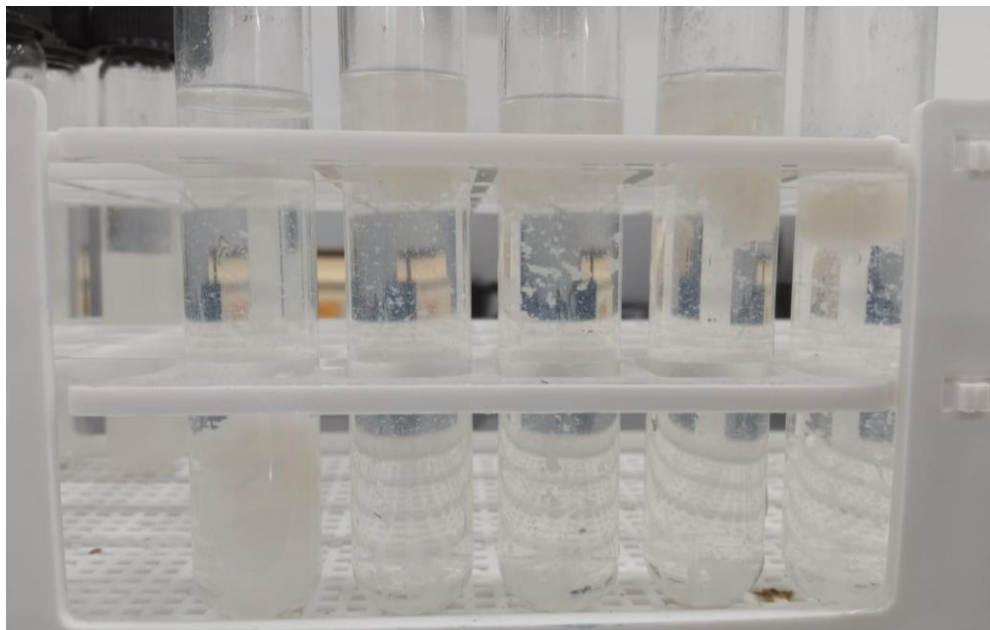
Medición de actividad enzimática, previa adición de ácido tricloroacético
Laboratorio bioprocesos industriales CIT UVG



Nota. Elaboración propia.

Figura 35.

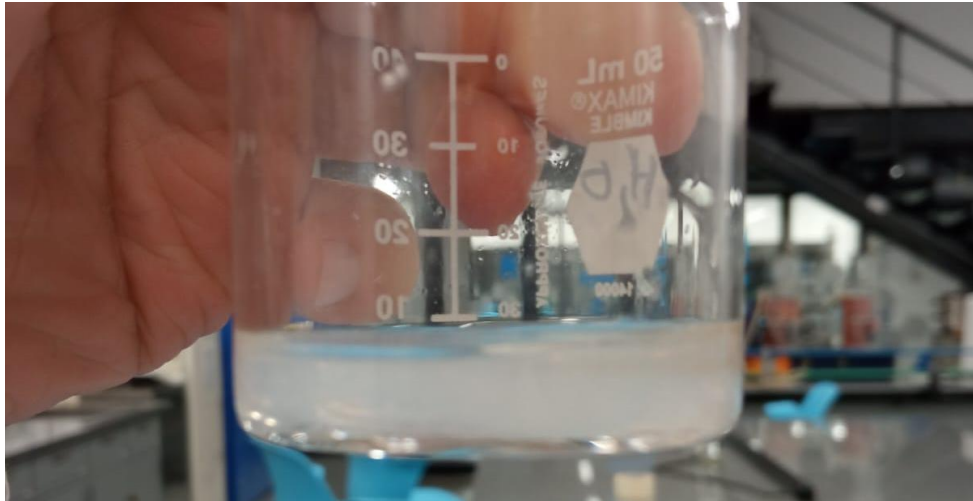
Precipitado de caseína, medición de actividad enzimática, post adición ácido tricloroacético Laboratorio bioprocesos industriales CIT UVG



Nota. Elaboración propia.

Figura 36.

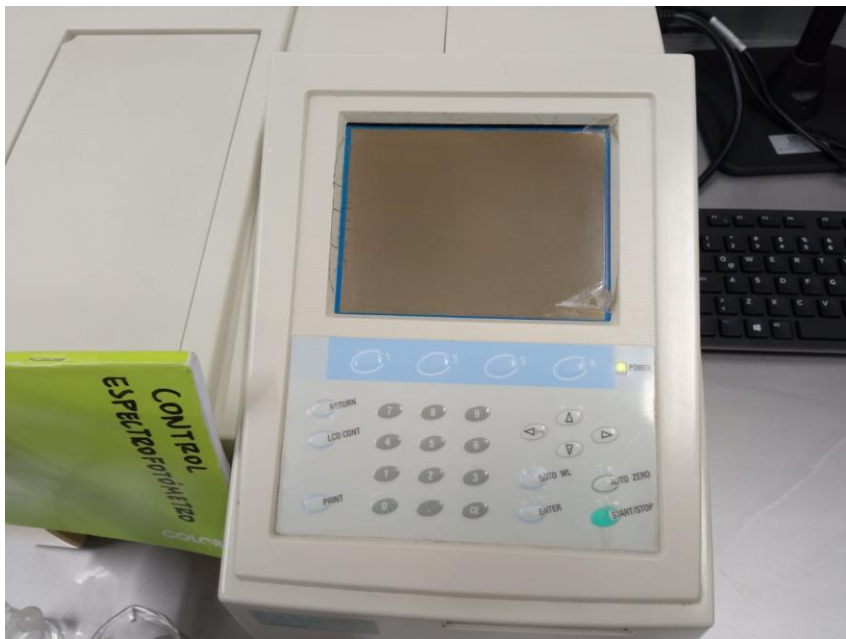
Solución filtrada medición de actividad enzimática precipitado de semillas de papaya Laboratorio bioprocesos industriales CIT UVG



Nota. Elaboración propia.

Figura 37.

Medición de absorbancias de actividad enzimática espectrofotómetro laboratorio bioprocesos industriales CIT UVG



Nota. Elaboración propia.

XIII. Glosario

a. Actividad enzimática

Capacidad de una enzima para catalizar una reacción bioquímica específica, expresada en términos de cantidad de sustrato transformado por unidad de tiempo.

b. Ácido tricloroacético

Ácido orgánico sólido cristalino y fuerte que tiene tres átomos de cloro unidos a un átomo de carbono y un grupo carboxilo.

c. EDTA

Edetato disódico, es un ligando quelante, perteneciente ácidos poliamino carboxílicos. Se caracteriza por su habilidad para formar complejos con iones metálicos.

d. Espectrofotométrico

Técnica analítica que se utiliza para medir la cantidad de luz absorbida por una sustancia en función de la longitud de onda.

e. Enlace-peptídico

Enlace que une dos aminoácidos en una proteína. Formado por una reacción de condensación entre el grupo amino y el grupo carboxilo dos aminoácidos.

f. Folin-Clocalteu

Solución química utilizada en el análisis cuantitativo de compuestos fenólicos, basado en el principio de oxidación que reacciona con los grupos fenólicos de estas sustancias para formar un complejo azul intenso.

g. Hidrolasa

Grupo de enzimas que catalizan reacciones de hidrólisis, mediante la ruptura de enlaces químicos por la adición de agua.

h. Isoeléctrico

Valor de pH en el cual una molécula, como una proteína o un aminoácido, tiene carga eléctrica neta igual a cero.

i. Látex

Jugo lechoso obtenido de la papaya, contiene una gran cantidad de compuestos orgánicos, principalmente compuesto por la enzima papaína.

j. Liofilizador

Equipo que permite eliminar el agua de un material (generalmente alimentos) mediante la congelación y sublimación del agua.

k. Proteolítico

Enzima que tiene la capacidad de descomponer proteínas mediante la ruptura de los enlaces peptídicos que mantienen unidas las cadenas de aminoácidos en una proteína.

l. Unidades de tirosina

Uno de los 20 aminoácidos estándar que se encuentran en las cadenas polipeptídicas, cuantificable en métodos espectrofotométricos.

m. USP

Farmacopea de los Estados Unidos, (United States Pharmacopeia).

n. Vermífuga

Sustancias que tienen la capacidad de eliminar parásitos intestinales del cuerpo.