



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC



DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ENCAPSULACIÓN SOBRE LA
ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA, ANTIOXIDANTE Y ANTI-INFLAMATORIA DE
EXTRACTOS DE SUBPRODUCTOS DE GUÁMARA Y COCUIXTLE**

Por:

ING. DARÍO BARRÓN CARRILLO

PROTOCOLO

Directora:

DRA. MARÍA DE LOURDES GARCÍA MAGAÑA

Co-director:

DR. JUAN ARTURO RAGAZZO SÁNCHEZ

TEPIC, NAYARIT

Enero, 2019

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE CUADROS.....	v
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	2
2.1 Generalidades de las <i>Bromelias</i>	2
2.2 Presencia y distribución de <i>Bromelias</i> en el mundo	3
2.3 Principales variedades y usos de <i>Bromelias</i>	3
2.4 Proteasas Vegetales	5
2.4.1 <i>Ananas comosus</i> , generalidades, morfología y propiedades	6
2.4.2 <i>Bromelia Pinguin</i> , generalidades, morfología y propiedades.....	9
2.4.3 <i>Bromelia Karatas</i> , generalidades, morfología y propiedades	14
2.5 Propiedades biológicas de proteasas vegetales.....	18
2.5.1 Efecto antiinflamatorio de proteasas	19
2.5.2 Ciclooxygenasa	20
2.6 Encapsulación de enzimas	21
2.7 Técnica del electro spraying	22
2.7.1 Aplicaciones de la técnica del electro spraying	25
CAPITULO 3. JUSTIFICACIÓN	27
CAPÍTULO 4. OBJETIVOS	28
4.1 Objetivo general	28
4.1.1 Objetivos específicos	28
CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.2 Caracterización fisicoquímica y bromatológica de los subproductos de frutos de <i>B. pinguin</i> y <i>B. karatas</i>	30
5.3 Obtención de proteasas de subproductos de <i>B. pinguin</i> y <i>B. Karatas</i> y determinación de propiedades importantes de estas enzimas.....	31
5.3.1 Concentración de proteína.....	31

5.3.2 Actividad proteolítica específica.....	32
5.3 Determinación de la capacidad antioxidante de las proteasas con mayor actividad proteolítica específica por el método FRAP y ABTS	33
5.3.1 FRAP	33
5.3.2 ABTS.....	34
5.4 Actividad antiinflamatoria	34
Ensayo ciclooxygenasa	34
5.5 Encapsulación de proteasas por electro spraying	36
5.5.1 Caracterización parcial de la solución polimérica.....	37
5.6 Propiedades evaluadas durante el almacenamiento de los encapsulados	37
5.6.1 Efecto fotoprotector.....	37
5.6.2 Análisis estadístico	38
CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
6.1 Caracterización de subproductos de <i>B. pinguin</i> y <i>B. karatas</i>	39
6.1.1 Análisis fisicoquímicos y bromatológicos	39
6.2 Obtención de proteasas de subproductos de <i>B. pinguin</i> y <i>B. karatas</i>	44
6.2.1 Concentración de proteína y actividad proteolítica de subproductos de <i>B. pinguin</i> y <i>B. karatas</i>	44
6.2.2 Concentración de proteína y actividad proteolítica de extractos proteolíticos encapsulados de subproductos de <i>B. pinguin</i> y <i>B. karatas</i>	48
6.3 Determinación de la capacidad antioxidante de las proteasas con mayor actividad proteolítica específica por el método FRAP y ABTS.	51
6.3.1 FRAP	51
6.3.2 ABTS.....	54
6.4 Actividad antiinflamatoria por el ensayo ciclooxygenasa	55
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES	60
CAPÍTULO 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
CAPÍTULO 9. ANEXOS	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Características botánicas de la guámara (<i>Bromelia pinguin</i>).....	9
Figura 2.2 Características botánicas de <i>Bromelia karatas</i>	15
Figura 2.3 Representación esquemática del proceso de electrospraying.....	24
Figura 5.1 Diagrama de flujo del proceso de la etapa I.....	30
Figura 5.2 Diagrama de flujo del proceso de la etapa II.....	36

LISTA DE CUADROS

Cuadro 2.1 Principales usos etnobotánicas y países relacionados	4
Cuadro 2.2 Proteasas de interés en la industria de alimentos	6
Cuadro 2.3 Propiedades físico-químicas de la piña (base húmeda)	7
Cuadro 2.4 Caracterización fisicoquímica del fruto de <i>Bromelia pinguin</i>	11
Cuadro 2.5 Actividad antibacterial de los extractos del fruto de <i>B. pinguin</i>	12
Cuadro 2.6 Parámetros bromatológicos de <i>Bromelia karatas</i> (g/100g)	16
Cuadro 2.7 Capacidad antioxidante de los zumos de pulpa de <i>B. Karatas</i>	17
Cuadro 2.8 Actividades biológicas de extractos proteolíticos vegetales	18
Cuadro 2.9 Efecto antiinflamatorio de bromelina	19
Cuadro 6.1 Parámetros fisicoquímicos de subproductos de <i>B. pinguin</i> y <i>B. karatas</i> g/100g BS	40
Cuadro 6.2 Parámetros Bromatológicos de subproductos de <i>B. pinguin</i> y <i>B. karatas</i> g/100g BS	44
Cuadro 6.3 Concentración de proteína y actividad proteolítica específica de subproductos de <i>B. pinguin</i> y <i>B. karatas</i>	45
Cuadro 6.4 Caracterización parcial de las soluciones poliméricas	47
Cuadro 6.5 Concentración de proteína y actividad proteolítica específica de los extractos proteolíticos de subproductos de <i>B. pinguin</i> y <i>B. karatas</i> en almacenamiento	50
Cuadro 6.6 Capacidad antioxidante por método FRAP y ABTS de extractos proteolíticos de la cáscara de <i>B. pinguin</i> y semilla de <i>B. karatas</i> en almacenamiento.	53
Cuadro 6.7 Actividad antiinflamatoria de extractos proteolíticos de cáscara de <i>B. pinguin</i> y semilla de <i>B. karatas</i> sin encapsular y encapsuladas	57

Cuadro 6.8 Efecto de la radiación UV sobre la actividad proteolítica específica de los extractos proteolíticos de cáscara de *B. pinguin* y semilla de *B. karatas* encapsuladas por 4 meses. 59

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Existen frutos de la familia de las *Bromelias* como la guámara (*B. Pinguin*) y cocuixtle (*B. karatas*) que han sido poco estudiadas, no obstante que éstas han sido utilizadas desde la antigüedad por sus propiedades curativas, existiendo algunos estudios en la pulpa en la que se resalta que son una fuente natural rica en proteasas, las cuales presentan actividades proteolíticas específicas, sin embargo en cáscaras y semillas de ambos frutos no se ha realizado ningún estudio hasta el momento.

Por otro lado estudios reportan que en otras *Bromelias* como la piña se han encontrado altas cantidades de proteasas como la bromelina, las cuales presentan actividades biológicas como antitrombóticas, antihelmíticas, fibrinolíticas, antiinflamatorias e incluso anticancerígenas, lo que permite pensar que las proteasas presentes en guámara y cocuixtle podrían tener características similares.

Por lo que en este trabajo se propone evaluar el efecto de la encapsulación sobre la actividad proteolítica específica, antioxidante y anti-inflamatoria de los extractos proteolíticos de cáscaras y semillas de guámara y cocuixtle, con el fin de preservar sus propiedades y que permita visualizar el inicio de su posible aprovechamiento y aplicación en la salud humana.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de las *Bromelias*

La familia de *Bromeliaceae* se conforma por casi 3,086 especies en 56 géneros, siendo México un centro de diversificación de grupos de *Bromelias*, registrando 18 géneros y 342 especies, de los cuales el 70% son endémicos (Castillo y cols., 2010).

La familia se subdivide en tres subfamilias: *Pitcairnioideae*, *Tillandsioideae* y *Bromelioideae*. La subfamilia *Pitcairnioideae* incluye a las *bromeliáceas* ancestrales y muchas recuerdan a la familia de las gramíneas, de la cual evolucionaron. Casi todas las especies son terrestres. Por su parte, la subfamilia *Tillandsioideae* presenta caracteres florales y frutales relativamente primitivos, aunque la mayoría de sus especies son epífitas, un estilo de vida evolucionado. Por su parte, la subfamilia *Bromelioideae* es la más evolucionada. Generalmente tienen hojas espinosas y sus semillas son a menudo distribuidas por los pájaros y animales, que consumen sus frutos carnosos. (Natalucci y cols., 2009).

Las *Bromelias* son plantas herbáceas, terrestres, litófitas que crecen sobre piedras o bien son epífitas que se desarrollan sobre árboles, y pertenecen a la familia *Bromeliaceae*. Usualmente tienen forma arrosetada y sin tallo, con las inflorescencias conspicuas que emergen generalmente del centro de la roseta, y con flores y frutos de colores muy vistosos. (Mondragón y cols., 2011).

Algunas *Bromelias*, particularmente aquellas que crecen en sitios secos, son de apariencia plateada, color que se debe a una capa de pelos absorbentes especializados (tricomas peltados) que capturan agua y nutrimentos, esta característica es muy importante, puesto que aquellas especies cubiertas por densa escamosidad foliar poseen mayor capacidad para sobrevivir a condiciones

de escasez de agua, es decir, tienden al xerofitismo. Otro grupo está formado por plantas terrestres que absorben nutrientes y agua principalmente por las raíces y combinan, a veces, tanques poco desarrollados con pelos absorbentes, (Mondragón y cols., 2011).

2.2 Presencia y distribución de *Bromelias* en el mundo

Debido a su gran adaptabilidad y resistencia a condiciones extremas como la baja disponibilidad de agua las *Bromelias* poseen un rango de hábitat muy amplio, abarcando desde los trópicos húmedos y calientes a los subtrópicos más fríos y secos. Si bien la mayoría de las especies proviene de Sudamérica, con el número más grande de especies halladas en Brasil, se extienden desde Chile y Argentina a través de Centroamérica y el Caribe, alcanzando el límite norte en los alrededores de Virginia, en el sudeste de los EE.UU. (Natalucci y cols., 2009), abarcando diversas altitudes, hasta los 4000 metros sobre el nivel del mar. Una única especie (*Pitcairnia feliciana*) ha sido encontrada en el oeste de África (Hornung-Leoni., 2011).

En la República Mexicana las *Bromelias* se localizan en las zonas tropicales y subtropicales, de donde se han reportado 342 especies repartidas en 18 géneros (Mondragón-Chaparro y cols., 2006; Castillo y cols., 2010). Entre los estados que sobresalen por su riqueza y su diversidad bromeliológica se encuentran Oaxaca, Chiapas, Veracruz, Jalisco y Guerrero. El estado de Oaxaca posee la mayor diversidad de *Bromelias* en el país (Miranda, 2007)

2.3 Principales variedades y usos de *Bromelias*

Diversas culturas han estado usando las *Bromelias* por millares de años. Los Aztecas, los Mayas, los Incas, los Quechuas, los Yanomami y otros pueblos los utilizaron para la alimentación, la fibra, las ceremonias, la medicina y como plantas ornamentales. (Hornung-Leoni, 2011a).

En los últimos años las *Bromelias* presentan usos muy variados en Latinoamérica, la mayor cantidad de especies (33) es para usos ceremoniales, se

enlistan 24 especies para usos comestibles, 20 especies para usos medicinales, 19 para fibra textil, 12 para usos ornamentales, 5 para cercas vivas y finalmente 2 especies para generación de combustible, como se muestra el Cuadro 2.1, con los países implicados por sus usos (Hornung-Leoni, 2011a).

Cuadro 2.1 Principales usos etnobotánicas y países relacionados

Uso	Total de especies	Países implicados
Comestible	24	Argentina, Bolivia, Chile, Colombia, Costa Rica, Cuba, Ecuador, El Salvador, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Perú, Puerto Rico, Venezuela.
Medicinal	20	Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Cuba, Ecuador, Honduras, México, Nicaragua, Perú, Puerto rico, Venezuela.
Fibra textil	19	Brasil, Bolivia, Chile, Ecuador, México, Nicaragua, Venezuela.
Ceremonial	33	Bolivia, México, Perú, Venezuela.
Ornamental	12	Argentina, Chile, Ecuador, México, Venezuela.
Combustible	2	Ecuador, Perú, México.
Cercas vivas	5	Colombia, Ecuador, México, Panamá, Venezuela.

(Hornung-Leoni, 2011a).

En México, se han documentado al menos nueve usos diferentes para 110 especies de *Bromelias*. Entre los usos reportados tenemos los siguientes (en orden decreciente):

- Valor ornamental por su belleza (*Tillandsia oaxacana*)
- Elementos en la construcción de pesebres y adornos navideños (*Tillandsia ionantha*)

- Elaboración artesanal de medicinas (*Tillandsia ustenooides*)
- Para ceremonias de carácter religioso (*Tillandsia imperialis*)
- Para forraje (*Hechtia glomerata*)
- Consumo humano (*Ananas comosus*)
- Fuente de fibra de alta calidad para la elaboración de elementos de charrería (*Aechmea magdalenae*)
- Elaboración de bebidas (*Bromelia karatas*)
- Elementos de construcción de cercas vivas (*Bromelia pinguin*).

Sin embargo, la mayoría de las especies se utilizan con fines ornamentales en hoteles, jardines, plazas y camellones, así como en arreglos florales (Miranda, 2007).

2.4 Proteasas Vegetales

Las proteasas de origen vegetal están involucradas en muchos aspectos de la fisiología de las plantas y su desarrollo, jugando un papel fundamental en procesos como la rotación de proteínas, la movilización de proteínas de reserva durante la germinación de la semilla, la senescencia y la modificación postraduccional de proteínas por proteólisis limitada en los sitios altamente específicos. La mayoría de estas proteasas han sido clasificadas como cisteín proteasas y, algunas como aspártico proteasas (González y cols., 2011).

A pesar del elevado número de integrantes de la familia *Bromeliaceae* es muy reducido el número de géneros que han sido estudiados en busca de enzimas proteolíticas (Natalucci y cols., 2009), siendo *Ananas comosus* (el “ananá” o “piña”) la especie más estudiada en este sentido de cuyos tallos se obtiene la bromelina, un extracto rico en cisteín endopeptidasas, una de las enzimas más comercializadas (Errasti y cols., 2013).

Las proteasas son hidrolasas que degradan los sustratos de origen proteico dando como resultado cadenas más cortas (péptidos) o aminoácidos libres. Su importancia radica en el abanico de aplicaciones que se les da en diversas

industrias. Son ampliamente utilizadas para la fabricación de bebidas, panificaciones, galletería, ablandadores de carne, síntesis del aspartame, clarificación de cerveza, fabricación de productos fermentados de soya y de pescado, saborizantes, así como en la elaboración de quesos, concentrados proteicos y producción de hidrolizados proteicos (Reyes y cols., 2011). En el Cuadro 2.2, se enlistan algunas de estas hidrolasas utilizadas en la industria de alimentos.

Cuadro 2.2 Proteasas de interés en la industria de alimentos

Enzima	Ejemplo	pH óptimo	Aplicación
Serín-proteasa	Alcalasa	Alcalino	Alargar la vida útil de los alimentos.
Cisteín-proteasa	Papaína	Cerca al neutro	Clarificación de cerveza, ablandado de carne.
Metal-proteasa	Termosilina	Cerca al neutro	Producción de hidrolizados proteicos.
Aspártico-proteasa	Renina	Ácido	Elaboración de quesos.

(Reyes y cols., 2011).

2.4.1 *Ananas comosus*, generalidades, morfología y propiedades

Ananas comosus, conocida comúnmente como ananá o piña; es una planta monocotiledónea, herbácea y perenne perteneciente a la familia *Bromeliaceae*, pertenece al género *Ananas* y especie *comosus* (Cerrato, 2013.). Fruto suramericano que se dio a conocer en Europa luego del viaje de Cristóbal Colón, la cual por su similitud con el fruto de los pinos se le denominó “pineapple” (Hornung-Leoni, 2011).

La demanda internacional de la piña sigue en crecimiento principalmente debido a los diferentes hábitos alimenticios de los consumidores que consideran a esta fruta tropical como una de las más finas del mundo, destacando en ella su agradable sabor, aroma y su contenido de vitamina C. (Garcidueñas, 2013). Además, por su alto contenido de fibra, pero, sobre todo porque es una fuente importante de vitaminas A, B1, B6, ácido fólico y minerales como el potasio. Es una fruta diurética que contribuye a la eliminación de toxinas por medio de la orina y que previene el estreñimiento porque contiene gran cantidad de fibra (Cerrato, 2013).

Hemalatha y Anbuselvi, (2013) presentaron las propiedades nutrimentales de la piña (Cuadro 2.3), Hossain y cols. (2015) mencionan que la piña contiene vitamina C que es el principal antioxidante soluble en agua del cuerpo, contra los radicales libres que atacan y dañan las células normales.

Cuadro 2.3 Propiedades físico-químicas de la piña (base húmeda)

Parámetros	Pulpa (piña)
Humedad (g/100g)	87.3
Contenido de cenizas (mg/100g)	1.8
Acidez valorable (g/100g)	2.03
Ácido ascórbico (mg/100g)	21.5
Azúcares reductores (g/100g)	10.5
Azúcares no reductores (g/100g)	7.4
Sólidos totales solubles (g/100g)	13.3
Azúcares totales (g/100g)	8.66
Fibra cruda (g/100g-fw)	0.41
Proteína (mg/100g)	7.2

(Hemalatha y Anbuselvi, 2013)

Por otra parte la piña es una fuente natural rica en proteasas y la mayor parte de la producción mundial de enzimas está destinada en la obtención de este tipo de

enzimas. En términos económicos, las proteasas representan casi las dos terceras partes de las enzimas que se comercializan en el mercado mundial (Carvajal y cols., 2010).

Las cisteín proteasas (EC 3.4.22) están ampliamente distribuidas entre los organismos vivos. La bromelina (EC 3.4.22.32) ha sido aislada de órganos de plantas de la familia *Bromeliaceae*. Se extrajo por vez primera, del jugo de la piña, a finales del siglo XIX (Hernández y cols., 2005).

Hernández y cols., (2005) realizaron una extracción de bromelina a partir de tallo de piña, se demostró que se alcanzan rendimientos de 20.8 g de extracto/kg de tallos y 3.9 g de proteína/kg de tallos, con una actividad específica de 1.36 UT/mg (Unidades de Tirosina/mg de proteína). El extracto aislado fue estable, con una fracción proteolítica mayoritaria de masa molar 24 500 Da., pH óptimo 7 y buena estabilidad en un rango de pH de 3-9 y temperaturas de hasta 50°C. Además García-Magaña y cols., (2018), al trabajar con la pulpa de piña reportaron una actividad proteolítica específica de 27.83 UT/mg de proteína.

La mayor y más antigua aplicación de la bromelina es como ablandador de carnes. En este contexto, los investigadores han dedicado sus esfuerzos a ablandar la carne mediante la inyección de enzimas proteolíticas en cadáveres de animales. El método demostró ser bastante prometedor, ofreciendo solamente dificultad para distribuir las enzimas uniformemente y requiriendo la inyección antes de la muerte del animal y, por lo tanto, siendo distribuido a través del sistema vascular antes del sacrificio. También se ha utilizado en la producción de los procesos convencionales de panadería, la adición de bromelina en la harina con alto contenido proteico la hace más adecuada a los procesos continuos comúnmente utilizados, ya que requiere tiempo de mezcla bastante bajo y masa con mayor extensibilidad al procesamiento, resultando en panes con mayor volumen y mejor simetría, textura y granularidad de la miga. (Coélho y cols., 2014)

Por otra parte la bromelina es ampliamente reconocida por sus propiedades biológicas, ya que presenta efectos antiinflamatorios, antibacterianos, antitrombóticos, fibrinolíticos, anticancerígenos y efectos inmunomoduladores, además de ser un agente de cicatrización (Rathnavelu y cols., 2016).

A parte de *Ananas comosus* se han obtenido proteasas a partir de frutas de *B. hemisferina*, *B. silvestris*, *B. palmeri* y *B. hieronymi* no obstante, su estudio está apenas en desarrollo, como es el caso de las enzimas proteolíticas de la guámara (*B. Pinguin*) y del Cocuixtle (*B karatas*) (López y cols., 2000).

2.4.2 *Bromelia Pinguin*, generalidades, morfología y propiedades

La planta se distribuye en el Neotrópico, desde las Antillas y norte de México hasta las Guayanas y Ecuador, donde se emplea como cercas vivas para separar linderos y es conocida por los nombres comunes guámara, conquistle, muta, maya, piñuela y piña de ratón, entre otros (Espejo Serna y cols., 2010), además de que se consumen las inflorescencias, flores y sus frutos (Hornung-Leoni, 2011). En la Figura 2.1 se muestra la *Bromelia pinguin*, desde la planta completa y sus diferentes partes.



Figura 2.1 Características botánicas de la guámara (*Bromelia pinguin*) Fuente: Meza-Espinoza y cols., (2017)

En Tamaulipas, México, se emplea la raíz y el fruto para hacer bebidas y, para la elaboración de dulces y medicinas, la flor y semillas; mientras que, en Puerto Rico, el eje de la inflorescencia se consume como vegetal fresco o cocinado y en Panamá se emplean los ácidos frutos para preparar bebidas mezcladas con agua y azúcar. Este fruto tiene un alto contenido de vitamina C y calcio (Hornung-Leoni, 2011).

Los frutos son empleados en la medicina tradicional como antihelmítico (antiparasitario), posiblemente por la presencia de una mezcla de cisteín endopeptidasas llamada “pinguinaina”. También el jugo ha sido empleado contra los tricocéfalos y otros parásitos similares, así como diurético y antirreumático; mientras que, en forma de cataplasma, se emplea para dislocaciones y fracturas. Por otro lado, se ha demostrado que presentan actividad contra bacterias patógenas como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Salmonella*, *Shigela*, *Escherichia* y *Pseudomonas* (Hornung-Leoni, 2011a).

También los frutos se han empleado como agentes fitoterapéuticos para tratamiento de tos, trastornos del tracto respiratorio, escorbuto y diabetes con previa inactivación por calor de la proteasa “pinguinaina” ya que su presencia combinada con los daños provocados por los rafidios de oxalato de calcio presentes en la cáscara de la fruta genera irritación en las yemas de los dedos y alrededor de la boca (Pío León y cols., 2009; Payrol y cols. 2005).

Análisis realizados en Cuba han detectado un alto contenido de componentes nutricionales, además de considerar el fruto como un alimento funcional por la presencia de compuestos fenólicos, terpenos, saponinas y ácidos grasos (Pío León y cols., 2009) en el Cuadro 2.4, se muestran los componentes nutricionales.

Cuadro 2.4 Caracterización fisicoquímica del fruto de *Bromelia pinguin*

Parámetros fisicoquímicos	
Composición proximal	g/100g b.s.
Humedad	80.4±0.311
Proteína	7.2±0.19
Lípidos	1.4±0.072
Cenizas	10.6±0.017
Fibra cruda	3.4±0.339
carbohidratos	77.3±0.340
Taninos ^b	ND ^g
Ácido fitico ^{b,d}	0.12±0.004
Minerales ^{b,d} (RDA ^e /AI ^f)	mg
Ca (1300mg ^e)	1290±80
Co (ND)	1.2±0.14
Fe (18mg ^f)	1.7±0
K (4700mg ^f) (NE)	903±56.6
Mg (420mg ^e)	500±40
Mn (2.3mg ^f)	2.95±0.212
Na (1500mg ^f)	ND
P (1250mg ^e)	56.6±5.77
Zinc (11mg ^e)	2.8±0
pH ^b	3.7±0.044 (
Acidez ^{b,c}	4.6±0.034
°Brix ^b	14.1±1.08
Vitamina C ^b (mg/100g)	126.0±2.25

^b Media±SD de 5 mediciones, ^c Determinado como porcentaje de ácido cítrico, ^d Valores son en base seca (b.s.) excepto la humedad, ^e Aportes dietéticos recomendados ^f Ingesta adecuada; NE= No Establecido, ^g ND. Concentración no detectable con el método empleado (Pío León y cols., 2009).

Por otro lado también Pío León y cols. (2009) presentaron un análisis de la actividad antibacterial del extracto de frutos de *Bromelia pinguin*, fraccionando dicho extracto con metanol (ME), hexano (HF), cloroformo (CF), acetato de etilo (EaF) y agua (AqF), para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC) sobre las bacterias mostradas en el Cuadro 2.5, comparando la MIC obtenida de cada extracto y fracción con la concentración mínima inhibitoria de gentamicina, un antibiótico aminoglucósido de amplio espectro, observando que el extracto con metanol y las fracciones realizadas con acetato de etilo y agua presentan actividad antibacterial posiblemente debido a que este extracto y fracciones presentaron una alta concentración en compuestos fenólicos, específicamente taninos y flavonoides.

Cuadro 2.5 Actividad antibacterial de los extractos del fruto de *B. pinguin*

Bacteria	MIC (mg/ml)				MBC (mg/ml)		
	G*	ME	EaF	AqF	ME	EaF	AqF
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	2	16	8	16	32	8	32
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	4	16	4	16	32	16	16
<i>Streptococcus</i> grupo A-4	0.5	8	4	8	16	4	32
<i>Salmonella</i> group D	0.5	16	8	16	32	16	32
<i>Salmonella typhi</i>	0.5	16	4	16	16	16	32
<i>Shigella flexnery</i>	0.5	8	2	16	64	4	32
<i>Shigella dysenteriae</i>	0.5	8	16	8	nb	32	16

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1	16	4	8	16	8	32
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0.5	16	8	16	64	16	32

nb sin efecto bactericida, MIC, concentración mínima inhibitoria, MBC concentración mínima bactericida, G* gentamicina ($\mu\text{g/ml}$), ME extracto con metanol, EaF fracción en acetato de etilo, AqF fracción acuosa. (Pío León y cols., 2009)

La pinguinaina es una glicoproteína similar a la papaína en propiedades pero presenta gran resistencia a la desnaturalización por calor. Se realizó la caracterización parcial de las proteasas encontradas en los extractos de frutas de *B. pinguin* colectadas en Culiacán, Sinaloa, México, donde los extractos enzimáticos mostraron una alta actividad proteolítica en condiciones ácidas (pH 2,0-4,0) y alcalinas neutras (pH 7,0-9,0), lo que indica que están presentes diferentes tipos de proteasas activas (Moreno-Hernández y cols., 2016); mientras que la actividad proteolítica a pH 3 fue estable en un amplio intervalo de temperatura (25-50 °C) con un óptimo a 45 °C. A temperatura superior a 50 °C, la actividad proteolítica disminuyó drásticamente con una pérdida de más del 80% a 60 °C, presuntamente causada por la desnaturalización por calor.

Además, mediante el uso de inhibidores específicos de la proteasa se indicó que las proteasas aspárticas, de cisteína y de serina son los principales tipos de proteasas presentes en los extractos enzimáticos en *Bromelia. pinguin* (Moreno Hernández y cols., 2016).

Moreno-Hernández y cols., (2017) realizaron la caracterización parcial de los extractos enzimáticos de frutos de *Bromelia pinguin* basado en su actividad coagulante de la leche (ACL) y la actividad caseinolítica. Se estudió el comportamiento de la ACL y los tiempos de coagulación de los extractos enzimáticos crudos (EEC) respecto a la temperatura de incubación. Se obtuvo

tiempos aceptables de coagulación (60-120 s) a temperaturas desde 40-85°C, por lo que el EEC puede usarse en este rango de temperaturas para conseguir la coagulación de la leche en tiempos aceptables. Con el propósito de conocer la naturaleza de la actividad proteolítica del extracto de *B. pinguin*, se determinó la actividad caseinolítica en el rango de pH 6.0-12.0 La máxima actividad caseinolítica se registró a pH 7.5 ($2.31 \text{ Ucas} \cdot \text{mg}^{-1}$), mientras que a pH superior a 10.0 el extracto fue inactivado.

Meza-Espinosa y cols., (2017) realizaron una caracterización parcial de proteasas obtenidas de *Bromelia pinguin* encontrando una actividad proteolítica 7.91 UT/mg de proteína, a un pH óptimo de 7 y una temperatura de 37 °C.

Con respecto a las cáscaras y semillas de los frutos no existe ningún estudio hasta el momento en busca de proteasas.

2.4.3 *Bromelia Karatas*, generalidades, morfología y propiedades

Bromelia Karatas es una planta terrestre, de hojas arrozetadas bastante aplanadas, la cual florece, fructifica y muere dejando un hijuelo en su reemplazo. Se caracteriza por la presencia de tomento suave de color café en cada una de sus partes. (Montes y cols., 2014). Se distribuye geográficamente en el Neotrópico creciendo en bosques tropicales caducifolios y subcaducifolios a una altura de 350-450msnm desde las Antillas y México hasta Brasil y Ecuador, floreciendo y fructificando de Enero a Marzo. Es conocida por los nombres comunes aguama, cocuixtle, piñuela, timbirichi, chichipo, chiyol, cham, cocuste, entre otros (Espejo Serna y cols., 2010). Reúne características especiales de acidez, aroma y resistencia al transporte, lo cual la convierte en un recurso potencial para su uso y aprovechamiento agroindustrial (Montes y cols., 2014).

El fruto es una baya agridulce y jugosa de cáscara hebrosa de color blanco amarillento o café oscuro, dependiendo del morfotipo; completamente ferrugíneo

tomentoso, fusiforme, estrecho hacia la parte basal y apical, pero más redondo en su parte central, de 9 a 12 cm de longitud distribuidos en: pedicelo 13.1 a 19.5 mm, ovario desarrollado 66 a 75.3 mm y restos, (sépalos, pétalos) 17.5 a 17.9 mm, diámetro de 1.9 a 2.7 cm (en la base 9.4 a 10.5 mm, media 21.6 a 23.6 mm, y ápice 10.4 a 11.7 mm), pulpa de color blanco dividida en tres lóculos (tricarpelar y/o trilocular) con dos series de semillas de placentación parietal, ubicadas alternamente hacia el centro, de color café a negro, subglobosas, de 3 a 4 mm de diámetro (Montes y cols., 2014). En la Figura 2.2, se muestra las características botánicas de *Bromelia karatas*



Figura 2.2 Características botánicas de *Bromelia karatas* Fuente: Meza-Espinoza y cols., (2017)

Se realizaron análisis bromatológicos y fitoquímicos de pulpa y cáscara de frutos verdes y maduros de *Bromelia karatas* colectados en Colombia por Moyano y cols. (2012), el cual se muestra en el Cuadro 2.6, además se evaluaron la funcionalidad antioxidante determinado el contenido de fenoles totales, capacidad total hidrosoluble (CATCH), el poder reductor férrico (PRF) y la capacidad inhibitoria del anión superóxido que se observa en el Cuadro 2.7.

Cuadro 2.6 Parámetros bromatológicos de *Bromelia karatas* (g/100g)

Cáscara Parámetro Bromatológico	Pulpa			
	Madura	Verde	Madura	Verde
% Materia Seca	24.88 ± 0.16	18.52 ± 0.09	23.41 ± 0.96	13.15 ± 0.13
% Cenizas	4.45 ± 0.22	6.40 ± 0.01	4.22 ± 0.05	12.0 ± 0.01
% Ext. Etéreo	0.28 ± 0.00	0.55 ± 0.03	2.65 ± 0.01	1.2 ± 0.06
% Proteína	1.60 ± 0.1	5.20 ± 0.01	3.13 ± 0.2	13.3 ± 0.2
% Fibra Bruta	18.9 ± 2.65	20.9 ± 0.15	0.61 ± 0.04	9.2 ± 0.01
Carbohidratos reductores	321.2 ± 1.01	18.3 ± 0.34	541.4 ± 0.49	20.3 ± 0.32
Carbohidratos totales	378.7 ± 0.96	34.7 ± 0.25	725.9 ± 0.84	72.3 ± 0.65
Vitamina C ¹	0.12 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Vitamina E ²	----	----	0.34 ± 0.05	0.12 ± 0.01
%Ca	0.19 ± 0.0	0.52 ± 0.0	0.29 ± 0.0	1.65 ± 0.0
%K	0.65 ± 0.0	0.47 ± 0.0	0.67 ± 0.0	0.63 ± 0.0
%Mg	1.22 ± 0.0	0.02 ± 0.0	0.47 ± 0.0	0.39 ± 0.0
%P	0.34 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.22 ± 0.0	1.14 ± 0.0
ppm Na	602 ± 0.0	207 ± 0.0	294 ± 0.0	579 ± 0.0
ppm Fe	295 ± 10.3	32 ± 2.1	56 ± 3.2	92 ± 3.8

¹(mg/ml extracto).

²(mg/100g fruta fresca)
(Moyano y cols., 2012)

Los análisis fisicoquímicos evidenciaron la presencia de flavonoides, terpenos, cumarinas, taninos y fenilpropanoides. Además, se observó que la presencia de los compuestos fenólicos, vitamina C y vitamina E es hasta 70% superior en los

frutos maduros que, en los frutos verdes, lo que explica los valores de capacidad antioxidante obtenidos (Moyano y cols., 2012).

Cuadro 2.7 Capacidad antioxidante de los zumos de pulpa de *B. Karatas*

Estadío	Contenido fenólico total ¹	CATCH ²	PRF ³	Inhibición del O ₂ ⁻⁴
Zumo Verde	290.3 ± 0.03	91.8 ± 0.67	2.48 ± 0.00	4.0 ± 0.00
Zumo Maduro	407.9 ± 0.01	169.7 ± 2.03	2.74 ± 0.00	35.3 ± 0.00
BTH		-----	1.66 ± 0.00	15.1 ± 0.01
Ácido ascórbico (500 µg/ml)		511.37 ± 0.19	0.353 ± 0.20	95.8 ± 0.00

* (mg EAG/100g): miligramo equivalente de ácido gálico por 100 gramos de fruta;

²(mg EAA/100g): miligramo equivalente de ácido ascórbico por 100 gramos de fruta; ³Abs 700nm; ⁴(%) porcentaje.

(Moyano y cols., 2012).

Se espera un futuro promisorio para los frutos maduros por ser una buena fuente de metabolitos antioxidantes, esta funcionalidad biológica podría ser comparable a la de antioxidantes universalmente reconocidos como BHT o el ácido ascórbico (Moyano y cols., 2012).

En México específicamente en Hidalgo se emplea las hojas de *Bromelia karatas* (“timbiriche”) para preparar un té contra la inflamación, además de usarse para la preparación de bebidas fresca (“aguas de sabor”). (Hornung-Leoni., 2011).

2.5 Propiedades biológicas de proteasas vegetales

Se ha reivindicado una amplia gama de actividades biológicas para las proteasas de origen vegetal, siendo la papaína (*Carica papaya*) y la bromelina (*Ananas comosus*) las especies más estudiadas en este sentido (Rathavelu y cols., 2016). En el Cuadro 2.8 se presentan varias propiedades biológicas de extractos proteolíticos a partir de vegetales.

Cuadro 2.8 Actividades biológicas de extractos proteolíticos vegetales

Fuente	Actividad biológica	Referencia
<i>Carica papaya</i>	Antimicrobianos	(Bansode y Chavan, 2013); Hornung-Leoni, 2011a)
<i>Carica papaya</i>	Antihipertensivos	(Vij and Prashar, 2015)
<i>Carica papaya</i>	Anticoagulantes	(Sivarajah, 2015)
<i>Ananas comosus</i>	Antitrombóticos	(Nipa y cols., 2008)
<i>Ananas comosus</i>	Fibrinolíticos	(Rathavelu y cols., 2016)
<i>Ananas comosus</i>	Digestivos	(Bansode y Chavan, 2013; Roy, 2008)
<i>Ananas comosus</i>	Desbridamiento dermatológico y cutáneo	(Roy, 2008)
<i>Ananas comosus</i>	Contra parásitos intestinales y diarrea	(Hornung-Leoni, 2011a)
<i>Ananas comosus</i>	Anticancerígenos	(Rathavelu y cols., 2016)
<i>Ananas comosus</i>	Antiinflamatorios	(Secor Jr y cols., 2005; Hale y cols., 2005)

2.5.1 Efecto antiinflamatorio de proteasas

Se ha realizado una gran diversidad de estudios sobre el efecto antiinflamatorio a partir de extractos proteolíticos de piña. La bromelina es un extracto crudo de la piña que contiene, entre otros componentes, varias proteinasas estrechamente relacionadas, demostrando, *in vitro* e *in vivo*, actividades antiinflamatorias. Su baja toxicidad los convierte en herramientas adecuadas para el control de enfermedades inflamatorias crónicas y para la terapia de trastornos inflamatorios. Estas proteinasas se emplean como aditivos complementarios para la quimioterapia (para reducir los efectos secundarios de los medicamentos) (Maurer, 2001).

En los pacientes que sufren enfermedades inflamatorias intestinales, la administración de bromelina reduce a las moléculas proinflamatorias también, se han reportado los beneficios de la bromelina para la sinusitis (Rathnavelu y cols., 2016). En el Cuadro 2.9 se mencionan estudios sobre el efecto antiinflamatorio de la bromelina.

Cuadro 2.9 Efecto antiinflamatorio de bromelina

Fuente	Probado	Referencia
<i>Ananas comosus</i> (bromelina)	Tratamiento con bromelina en un modelo murino inducido por ovoalbúmina (OVA) de enfermedad de las vías respiratorias alérgicas (DAA). La bromelina atenuó el desarrollo de AAD.	(Secor Jr y cols., 2005)

<i>Ananas comosus</i> (bromelina)	Se probó en la gravedad clínica e histológica de la enfermedad inflamatoria del intestino (EII) en IL-10 / ratones tratados oralmente con bromelina in vivo.	(Hale y cols., 2005)
<i>Ananas comosus</i> (bromelina)	Tratamiento in vitro de la bromelina en citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas mediante tejido de biopsia de colon obtenido de pacientes con enfermedades inflamatorias intestinales (EII) y de controles normales, sin EII.	(Onken y cols., 2007)
<i>Ananas comosus</i> (bromelina)	Apliación de bromelina en modelos de inflamación en la rata, la administración in vivo, la bromelaina puede inducir una disminución evidente en las concentraciones de prostaglandina E2 (PGE2) y la sustancia P (SP) SP en el exudado inflamatorio.	(Gaspani y cols., 2002)

2.5.2 Ciclooxygenasa

La ciclooxygenasa (COX, también llamada prostaglandina H sintasa o PGHS) es una enzima bifuncional que exhibe actividades COX y peroxidasa. El componente COX convierte el ácido araquidónico en un endoperóxido de hidróperóxido (PGG₂) y el componente de la peroxidasa reduce el endoperóxido al correspondiente alcohol (PGH₂), el precursor de las prostaglandinas (PG), los tromboxanos y las prostaciclina (Norregaard y cols., 2015).

Ahora está bien establecido que hay dos isoformas distintas de COX. La COX-1 se expresa constitutivamente en una variedad de tipos de células y está

involucrada en la homeostasis celular normal. Una variedad de estímulos, tales como ésteres de forbol, lipopolisacáridos y citoquinas, conducen a la expresión inducida de una segunda isoforma de COX. COX-2 es responsable de la biosíntesis de las PG en condiciones inflamatorias agudas. Se cree que esta COX-2 inducible es la enzima diana para la actividad antiinflamatoria de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (Harris y Zhang, 2011).

Las PG surgen del metabolismo enzimático del ácido araquidónico (AA) libre, que se escinde de los fosfolípidos de la membrana por la actividad de la fosfolipasa A2 (Norregaard y cols., 2015)

2.6 Encapsulación de enzimas

La encapsulación se puede definir como una técnica por la cual gotas líquidas, partículas sólidas o gaseosas, son cubiertas con una película polimérica porosa conteniendo una sustancia activa (Parra, 2010), esta membrana, barrera o película está generalmente hecha de componentes con cadenas para crear una red con propiedades hidrofóbicas y/o hidrofílicas (Fuchs y cols., 2006). El desarrollo exitoso de estos sistemas de encapsulación se basa, en el conocimiento sobre la estabilidad del componente que se desea proteger (microorganismos, aceites esenciales, enzimas y antioxidantes, etc.) de los distintos factores que podrían afectarlo, como el calor, pH, oxígeno, rayos UV, entre otros, además conocimiento sobre las propiedades de los materiales para la encapsulación (matriz) y el método para la formación de las cápsulas. (Lupo y cols., 2012; Nazzaro y cols., 2012).

Se utiliza de igual manera el término de microencapsulación en la industria alimentaria, cuando se encapsulan sustancias de bajo peso molecular o en pequeñas cantidades, aunque los dos términos, encapsulación y microencapsulación, se emplean indistintamente. Respecto al área de alimentos, las aplicaciones de esta técnica se han ido incrementando debido a la protección de los materiales encapsulados de factores como calor y humedad, permitiendo

mantener su estabilidad y viabilidad. Las microcápsulas, ayudan a que los materiales alimenticios empleados resistan las condiciones de procesamiento y empaque mejorando sabor, aroma, estabilidad, valor nutritivo y apariencia de sus productos (Parra, 2010).

Muchas sustancias pueden ser encapsuladas en partículas en polvo sólidas o ellas pueden ser microencapsuladas en emulsiones estructuradas (Kaufmann and Palzer, 2011). Estudios que se han realizado se han encapsulado perfumes, fertilizantes, (Madene y cols., 2006), aceite de limón, fármacos (Muthuselvi y Dhathathreyan, 2006), prebióticos, nutraceúticos (Sozer and Kokini, 2009; Bastos y cols., 2009), semillas de frutas como banano, uvas, guayaba, papaya, manzana, mora, granadilla y semillas de cítricos también han sido encapsuladas entre otras sustancias (Rai y cols., 2009).

Al respecto, la encapsulación ofrece grandes alcances para la conservación de colorantes, enzimas, fitoesteroles, luteína, ácidos grasos, pigmentos vegetales, antioxidantes (Champagne y Fustier, 2007), componentes de aromas, vitaminas y minerales (Fuchs y cols., 2006).

Los materiales que se utilizan para el encapsulamiento pueden ser polímeros de carácter lipídicas, proteicas, o a partir de carbohidratos, estos últimos son extensivamente empleados en la encapsulación, se utiliza la técnica de secado por aspersión para ingredientes alimenticios como soporte de encapsulamiento, dentro de este amplio grupo se encuentran los almidones, maltodextrinas y gomas (Madene y cols., 2006). Recientemente una de las principales técnicas de encapsulación para sustancias termosensibles es el electrospraying.

2.7 Técnica del electrospraying

El proceso de secado por pulverización se ha utilizado durante décadas para encapsular ingredientes alimenticios tales como sabores, lípidos y carotenoides. Durante este proceso de secado, la evaporación del disolvente, que es más frecuentemente agua, es rápida y el atrapamiento del compuesto de interés

ocurre casi instantáneamente. Esta propiedad requerida impone una selección estricta de los materiales de encapsulación que se van a utilizar además de una optimización de las condiciones de funcionamiento (Gharsallaoui y cols., 2007).

Dentro de las variables que influyen en el proceso se puede distinguir entre aquellas propias de la suspensión: densidad de la suspensión, contenido en sólidos, viscosidad, tensión superficial, temperatura de la suspensión, estado de defloculación y distribución de tamaños de partícula de las materias primas; y las del equipo de secado: temperatura, caudal, humedad relativa del aire de secado, presión de inyección y el diámetro de salida del inyector (Mondragón y cols., 2013). Igualmente, si el compuesto encapsulado es de naturaleza hidrófoba, también debe considerarse la estabilidad de la emulsión de alimentación antes del secado. (Gharsallaoui y cols., 2007).

Sin embargo, el secado por pulverización implica el uso de una corriente de gas caliente para secar rápidamente las gotitas finas producidas en su etapa de atomización inicial, lo que resulta perjudicial para los bioactivos termosensibles hidrófobos. Por el contrario, el electrospraying (una técnica basada en el procesamiento electrohidrodinámico de las masas fundidas, soluciones o dispersiones de polímeros) se puede realizar bajo condiciones suaves (López-Rubio y Lagaron, 2012).

La electropulverización (pulverización electrohidrodinámica) es un método de atomización de líquidos por medio de fuerzas eléctricas. Esta tecnología permite la producción de estructuras de nano y microencapsulación sometiendo el fluido polimérico, que es bombeado a través de un capilar conductivo, a un campo eléctrico de alta tensión. Como resultado, un chorro de polímero cargado es expulsado hacia el electrodo opuesto, que se descompone en gotitas finas durante el vuelo, generando partículas poliméricas secas sobre la evaporación del disolvente antes de ser depositado sobre el colector (Córdoba-López y cols., 2016; Bhushani y Anandharamakrishnan, 2014). La instalación típica para el

electrospraying está constituida principalmente por cuatro componentes: (1) una fuente de alta tensión (1-50 kV) normalmente operada en modo de corriente continua (aunque también es posible el modo de corriente alterna), (2) una bomba de jeringa, (3) una hilera (típicamente una aguja de jeringuilla hipodérmica), y (4) un colector conectado a tierra (una placa plana) como se muestra en la Figura 2.3 (Bhushani y Anandharamakrishnan, 2014).

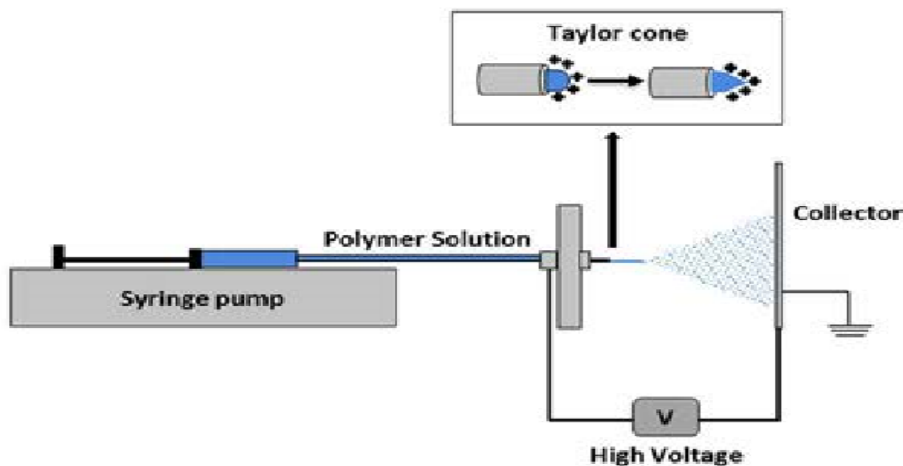


Figura 2.3 Representación esquemática del proceso de electrospinning (Drosou y cols., 2017)

El tipo de polímero, el peso molecular y la concentración son factores muy influyentes en el proceso de electropulverización; es decir, el cambio de la concentración del polímero y el peso molecular afectan en gran medida la viscosidad y la tensión superficial de la solución. Para tener un proceso estable, es importante tener en cuenta la viscosidad de la solución de polímero; con una concentración creciente, el aumento de la viscosidad conduce a la producción de cápsulas de mayor tamaño. La tensión superficial desempeña un papel en el proceso de electropulverización, ya que afecta la facilidad de formación inicial de gotas a medida que la solución sale de la boquilla. Vale la pena mencionar que las gotas iniciales se forman cuando las fuerzas electrostáticas superan la tensión superficial del chorro líquido emergente, y luego estas gotas iniciales

explotan en gotas más pequeñas a medida que viajan en el campo electrostático entre la boquilla (generalmente con carga positiva) y el colector (generalmente con carga negativa) (Drosou y cols., 2017)

La distancia entre la punta-colector también puede afectar el tamaño de las cápsulas y tener un impacto en la morfología del producto final, el aumento de la distancia punta-colector disminuye el tamaño promedio de partículas. Además, el aumento de la distancia conduce a morfologías más esféricas ya que las cadenas de polímero tienen tiempo suficiente para difundirse dentro de la gota. Sin embargo, debe señalarse que si se aumenta la distancia entre el colector de punta y el colector a más de un umbral, se interrumpirá la rotura de la gota debido a un campo eléctrico demasiado débil (Drosou y cols., 2017).

2.7.1 Aplicaciones de la técnica del electrospraying

La tecnología del electrospraying se ha utilizado para la formación del revestimiento comestible en los materiales alimenticios con la barrera mejorada de características funcionales (Bhushani y Anandharamakrishnan, 2014). Recientemente se está convirtiendo en una alternativa simple y atractiva para la encapsulación de agentes bioactivos lábiles con aplicaciones prometedoras en el campo de los alimentos funcionales (Bhushani y Anandharamakrishnan, 2014; Pérez-Masiá y cols., 2014). La encapsulación de compuestos bioactivos de alimentos en partículas electropulverizadas mejora su estabilidad y sus propiedades de liberación controlada (Bhushani y Anandharamakrishnan, 2014).

También se ha propuesto recientemente la electrosprayación de emulsión para la encapsulación de fármacos (Wang y cols., 2014) y para el desarrollo de microcápsulas citocompatibles usando matrices de carbohidratos, además se ha informado de la electropulverización de emulsiones estabilizadas con concentrado de proteína de suero de leche (WPC) para la microencapsulación y protección de compuestos bioactivos de interés (Pérez-Masiá y cols., 2014)

Se ha utilizado la técnica de electrospraying en emulsión para desarrollar estructuras de microencapsulación basadas en proteínas para la protección de alanina (utilizado como un compuesto modelo bioactivo hidrófobo termosensible) y se comparó con una tecnología bien establecida utilizada en la industria alimentaria tal como el secado por pulverización. Siendo alanina un compuesto termosensible, el secado por pulverización era inapropiado para este propósito, degradando completamente el ácido graso ω -3. La técnica de electrospraying demostró ser una alternativa satisfactoria, logrando eficiencias de microencapsulación de hasta $67\% \pm 5\%$ y retrasando significativamente la oxidación de alanina durante los ensayos de degradación acelerada a 80°C (Gómez-Mascaraque y López-Rubio, 2015). La aplicación de la técnica del electrospraying en la inmovilización de enzimas no ha sido muy explorada (Bhushani y Anandharamakrishnan, 2014), por lo que resulta ser una alternativa de gran interés en el desarrollo de este trabajo.

CAPITULO 3. JUSTIFICACIÓN

Existen frutos de la familia de las *Bromelias* como la guámara (*Bromelia pinguin*) y cocuixtle (*Bromelia Karatas*) de los cuales en estudios realizados se ha encontrado que la pulpa de ambos frutos son una fuente natural rica en proteasas con altas actividades proteolíticas, sin embargo hasta el momento no se han realizado estudios en sus cáscaras y semillas en busca de proteasas.

Por otro lado en subproductos de otras *Bromelias* como la piña (*Ananas comosus*) se han reportado considerables concentraciones de proteasas que además, de su actividad proteolítica característica se ha relacionado con actividades antitrombóticas, antihelmínticas, fibrinolíticas, antiinflamatorias e incluso anticancerígenas, lo que permite pensar que las proteasas presentes en subproductos de guámara y cocuixtle podrían tener características similares.

En base a esto se desarrolla el presente trabajo en el que se propone la obtención de extractos proteolíticos de subproductos de guámara y cocuixtle, su preservación mediante la encapsulación y que esto marcaría el inicio de su posible aprovechamiento y aplicación en la salud.

CAPÍTULO 4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la encapsulación sobre la actividad proteolítica específica y antiinflamatoria de los extractos proteolíticos de subproductos de guámara y cocuixtle.

4.1.1 Objetivos específicos

1. Caracterización físico-química de los subproductos (semillas y cáscaras) de los frutos de guámara y cocuixtle.
2. Evaluar la capacidad antioxidante, antiinflamatoria y actividad proteolítica específica del extracto proteolítico, obtenidos de semillas y cáscaras de guámara y cocuixtle.
3. Encapsular las proteasas obtenidas del subproducto con mayor actividad proteolítica específica de guámara y/o cocuixtle.
4. Evaluar algunas propiedades de interés (actividad proteolítica específica, capacidad antioxidante, radiación UV y actividad antiinflamatoria) en los encapsulados durante un período de almacenamiento.

CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS

Para cumplir con los objetivos planteados, el trabajo a desarrollar se dividió en dos etapas, la primera se centró en la caracterización fisicoquímica, bromatológica así como en la obtención de proteasas y determinación de propiedades importantes de estas enzimas extraídas de los subproductos de frutos de *B. pinguin* y *B. karatas*; mientras que en la segunda etapa se trabajó en la encapsulación de proteasas obtenidas del subproducto con mayor actividad proteolítica y su estabilidad durante su almacenamiento.

Etapa I: Caracterización de los subproductos de frutos de *B. pinguin* y *B. karatas*.

5.1 Obtención y preparación de las muestras

Los frutos de guamara y cocuixtle se obtuvieron del poblado de Tepic, Nayarit. Se seleccionaron los frutos con características homogéneas y se trasladaron al laboratorio donde fueron lavados, desinfectados (hipoclorito de sodio 50 ppm) y después de secarse, se despulparon y liofilizaron para realizar los análisis de cada que permitieran el cumplimiento con los objetivos del presente proyecto.

En la Figura 5.1 se muestra el diagrama de flujo del proceso desarrollado para la etapa I.

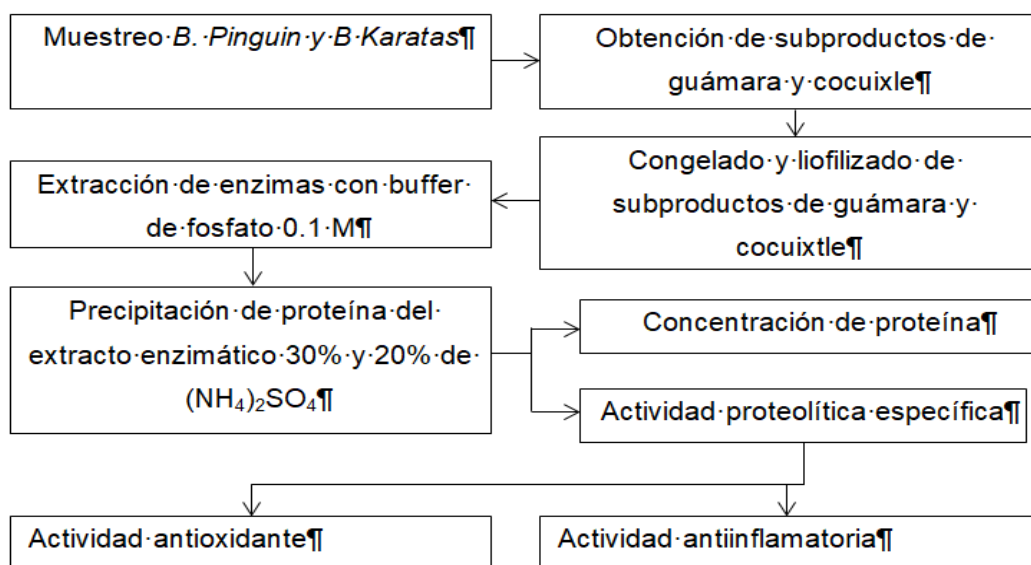


Figura 5.1 Diagrama de flujo del proceso de la etapa I

5.2 Caracterización fisicoquímica y bromatológica de los subproductos de frutos de *B. pinguin* y *B. karatas*

La acidez titulable (AT) se realizó por el método Método 981.12. Los sólidos solubles totales (SST) se determinaron con un refractómetro (Abbe 315RS, Royal Tunbridge Wells, Reino Unido) (Método 932.12, AOAC, 2005). El pH se realizó mediante el método potenciométrico (método 981.12) de la AOAC (AOAC, 2005) Todos los análisis se realizaron por triplicado.

El contenido de humedad (método 934.06), proteína (método 978.04), lípidos totales (método 950.54) y cenizas (método 940.26) se determinaron de acuerdo con los métodos oficiales de la AOAC (AOAC, 2005). Los carbohidratos solubles (CS) se midieron por el método de fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956). La fibra dietética soluble (FDS), la fibra dietética insoluble (FDI) y fibra dietética total (FDT), que es la suma de FDS y FDI, se analizaron mediante el método enzimático-gravimétrico AOAC (método 991.42), modificado por Mañas y Saura - Calixto (1995). Los datos se expresaron en gramos por 100 g en base seca (g/100 g bs)

5.3 Obtención de proteasas de subproductos de *B. pinguin* y *B. karatas* y determinación de propiedades importantes de estas enzimas.

Para la extracción enzimática se siguió la metodología empleada por López y cols., (2000). Se homogeneizó en un mezclador 10 g de muestra con 250 ml de Buffer de fosfato de sodio (0.1 M, 4 °C, PH 6.0, 5 mM de L-cisteína). La suspensión se filtró para eliminar los restos insolubles de la muestra y se centrifugó (6000 g, 30 min, 4 °C) (Hermle, Z32HK Labortechnik GmbH, Wehingen, Germany). El sobrenadante de *B. karatas* y *B. pinguin* se precipitaron con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pero a una concentración de 20% y 30% respectivamente, con respecto al volumen del sobrenadante, se filtraron, y el retenido se dializó por 20 h haciendo cambio de agua cada 5 h en las primeras 10 h. Se recuperó el dializado y se liofilizó para posteriormente ser resuspendido en Buffer de fosfato de sodio. Posterior al análisis de los datos anteriores se determinó la concentración de proteína y la actividad proteolítica

5.3.1 Concentración de proteína

La concentración de proteína se determinó por el método propuesto por Bradford, (1976). Este método se basa en el cambio de color del compuesto azul brillante de Coomassie G250 de roja a azul al formar un complejo colorante-proteína, el cual tiene un coeficiente de extinción alto que implica una gran sensibilidad en la determinación. La formación del complejo colorante-proteína es rápida (aprox 2 min) y permanece en solución aproximadamente 1 h.

Se colocó 0.1 ml de solución proteica con 1 ml de reactivo de Bradford y se mezcló por agitación en Vórtex, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (JENWAY 6705, Bibby Scientific Limited, OSA, UKA) a 595 nm entre 5 min después de la reacción. El blanco se preparó con 0.1 ml de buffer de fosfato de sodio 0.1 M con 1 ml de reactivo de Bradford. Se elaboró una curva de calibración con soluciones estándar de albúmina de suero de bovino (BSA, por sus siglas en inglés) y la concentración de proteína fue reportada en...Las determinaciones se realizaron por triplicado.

5.3.2 Actividad proteolítica específica

La actividad proteolítica se midió siguiendo el método empleado García-Magaña et al (2018) . Se hizo reaccionar 1.1 ml de solución de albúmina al 1% en buffer de fosfatos (pH 6.0, 12.5 mM de L-cisteína) con 0.1 ml de solución de enzima a 37°C. La reacción finalizó agregando 1.8 ml de ácido tricloroacético (TCA, por sus siglas en inglés) al 5%.

Se centrifugó la solución (18,500 g, 10 min) (Hettich, MIKRO 200R, Andreas Hettich GmbH y Co., Tuttlingen, Germany) y se midió la absorbancia del sobrenadante a 280 nm en un espectrofotómetro (JENWAY, 6705, Bibby Scientific Limited, OSA, UK). Se realizó la medición de la absorbancia a 280 nm por ser la longitud de onda a la cual los aminoácidos tirosina y triptófano absorben por la presencia de sus grupos cromóforos (Pace y cols., 1995).

Se realizó una curva de calibración de tirosina con soluciones desde 10 hasta 3000 $\mu\text{mol/ml}$ en buffer de fosfato (pH 6.0) y se midió la absorbancia a 280 nm. Los resultados se representaron en una gráfica Absorbancia vs Concentración de tirosina. Posteriormente se transformaron las absorbancias leídas en la actividad proteolítica en equivalentes de tirosina con la ecuación obtenida de la curva de calibración.

La actividad proteolítica específica se reportó en Unidades de Tirosina (UT), definida como el cambio de la concentración de tirosina/mg de proteína de reacción a 37 °C.

$$UT_{37^{\circ}C} = \frac{\Delta\text{Concentración de tirosina}}{V_{\text{enzima}} * t * C_{\text{enzima}}} * \frac{V_{\text{reacción}}}{V_{\text{enzima}}}$$

Donde, **Δ Concentración de tirosina**, es la diferencia de la concentración de tirosina en la muestra problema y el testigo; **V enzima**, volumen de la solución de la enzima (0.1ml); **t**, tiempo de hidrólisis (5 min); **V reacción**, volumen empleado en la reacción (3ml); **C enzima**, concentración enzimática obtenida por el método Bradford.

Se prepararon testigos de cada extracto enzimático colocando 0.1 ml de solución enzimática con 1.8 ml de TCA 5% previo a la adición de la solución de albúmina de huevo y los tratamientos térmicos. El blanco se preparó con 1.2 ml de buffer y 1.8 ml de TCA 5%.

5.3 Determinación de la capacidad antioxidante de las proteasas con mayor actividad proteolítica específica por el método FRAP y ABTS

5.3.1 FRAP

El método consiste en la reducción del complejo Tripiridiltriazina férrica (Fe^{3+} -TPTZ) a la forma ferrosa (Fe^{2+} -TPTZ) por un antioxidante en medio ácido, produciendo un compuesto de color azulado que es monitoreado midiendo la absorbancia a 595nm durante 30 min (Benzie y Strain, 1996).

La determinación se realizó en un espectrofotómetro de UV.VIS (Cintra doublé beam UV- Visible Spectrometer). Se preparó el reactivo FRAP colocando en una relación 10:1:1 buffer de acetato de sodio 0.3 M (PH 3.6), cloruro férrico hexahidratado 20 mM y TPTZ 10 mM (en solución de HCl 40 mM), respectivamente. La cantidad del reactivo a preparar se determinó con relación a la cantidad de determinaciones a realizar en cada ocasión, considerando que estas se realizaron por triplicado y que se requieren 900 μl del reactivo para cada determinación. Se preparó una curva de calibración de Trolox a concentraciones de 130 μM , 65 μM , 32.5 μM , 16.25 μM , y 8.125 μM .

Se colocó por triplicado 900 μl de reactivo FRAP, 90 μl de agua destilada y 30 μl de solución proteica en la cubeta, se agitó manualmente durante 20 segundos y se colocaron por orden de agitación en la celda de espectrofotómetro UV-VIS (Cintra doublé beam UV- Visible Spectrometer). Se leyó la absorbancia a 595 nm a los 30 minutos, se dejó la cubeta dentro del espectrofotómetro UV-VIS (Cintra doublé beam UV- Visible Spectrometer) hasta la lectura de los 30 minutos o bien se conservó en ausencia de luz. El blanco se preparó con; 900 μl de reactivo FRAP, 120 μl de agua destilada.

5.3.2 ABTS

Se empleó el método propuesto por Re y cols., (1999), el cual se basa en la capacidad de una sustancia antioxidante para capturar el radical ABTS^{•+} (ácido 2,2' azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) lo cual provoca un descenso en la absorbancia a 730 nm.

La determinación se realizó en un espectrofotómetro de UV-VIS (Cintra doublé beam UV- Visible Spectrometer). Se preparó una solución ABTS 7 mM en Buffer de fosfatos 0.1 M (PH 7.4) con persulfato de potasio (2.45 mM), a partir de esta se realizaron diluciones con el buffer de fosfatos de sodio hasta obtener una absorbancia de 0.7; se preparó una cantidad de ésta con relación a la cantidad de determinaciones a realizar en cada ocasión, considerando que estas se realizaron por triplicado y que se requieren 1800 µl del reactivo para cada determinación. Se preparó una curva de calibración de Trolox a concentraciones de 600 µM, 300 µM, 150 µM, 75 µM y 37.5 µM.

Se colocó 1800 µl de solución ABTS y 200 µl de solución proteica en una cubeta para espectrofotómetro y se agitó manualmente durante 20 segundos y se colocó por orden de agitación en la celda de espectrofotómetro UV-VIS (Cintra doublé beam UV- Visible Spectrometer). Se leyó la absorbancia a 734 nm a los 7 minutos, se dejó la cubeta dentro del espectrofotómetro UV-VIS (Cintra doublé beam UV- Visible Spectrometer) hasta la lectura de los 7 minutos o bien se conservó en ausencia de luz. El blanco se preparó con; 1800 µl de solución ABTS y 200 µl de buffer de fosfatos.

5.4 Actividad antiinflamatoria

Ensayo ciclooxygenasa

El ensayo de cliclooxygenasa se realizó con la técnica Maclouf y cols., (1987) con algunas modificaciones de Ramadwa y cols., (2017). Brevemente las muestras

se prepararon a una concentración de proteasas de 2.6mg/mL empleando como disolvente el agua milliQ. Posteriormente se realizó la reacción homogeneizando 10 µL de muestra de proteasas, 160 µL de buffer de reacción, 10 µL de cofactor heme y 10 µL de controles DUP267 (Control positivo COX2) y SDP-60 (Control positivo COX1). El sustrato (ácido araquidónico 20 µL) se adicionó a la mezcla y esta se homogeneizó por agitación durante 10 minutos a 37°C y posteriormente se adicionó cloruro de estaño (83.3 mg/mL) para detener la reacción, para finalmente las muestras ser colocadas en celdas de 96 pozos.

Posteriormente las muestras se sometieron a una segunda reacción con la finalidad de detectar la potencial inhibición de formación de prostaglandinas, en esta etapa se utilizó el reactivo Ellmans, con el cual se hizo el atrapamiento de las prostaglandinas formadas y funcionó como enlazador en los receptores endócrino presentes en la mezcla de reacción. Posterior al mezclado con el reactivo Ellmans, se sometió a incubación durante 18 hrs a 37°C, en incubación orbital. Posterior al tiempo de incubación, se realizaron lavados para la remoción de los reactivos, se adicionó 200 µL del reactivo Ellmans y se dejó incubando durante 1 hr, para finalmente leer la placa a una longitud de onda de 415 nm. Se calculó el porcentaje de inhibición de las ciclooxygenasas y la formación de prostaglandinas considerando como 100% de inhibición a la actividad de los controles positivos.

Etapas II, Encapsulación de proteasas obtenidas del subproducto con mayor actividad proteolítica y evaluación de algunas propiedades durante su almacenamiento.

En la figura 5.2 se muestra el diagrama de flujo del proceso que se desarrolló para la etapa II.

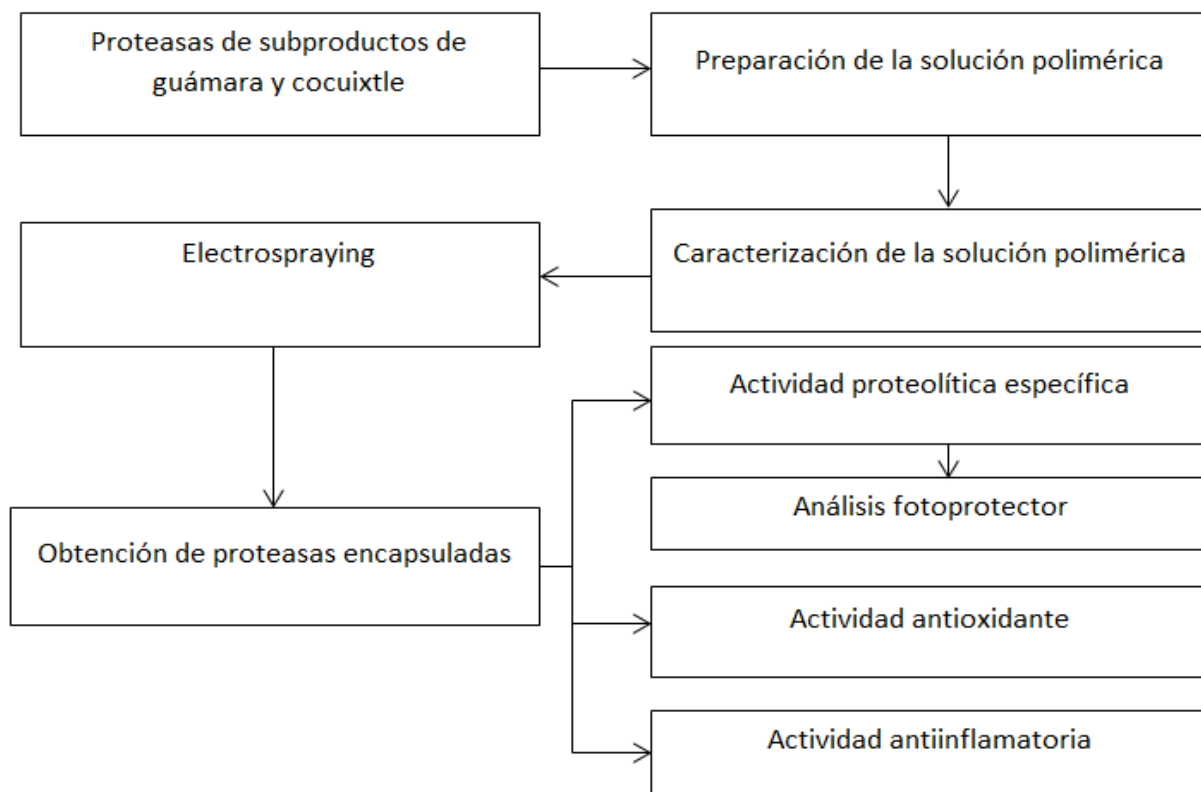


Figura 5.2 Diagrama de flujo del proceso de la etapa II

5.5 Encapsulación de proteasas por electrospaying

Se preparó una solución, 2 g de fructanos de alto grado de polimerización (fructanos de agave) en 8 ml de agua destilada, a la solución se le agregaron el 0.2 g de Tween 20 con respecto a la solución de fructanos, finalmente se adicionó 300 μ L de solución proteica y se agitó en placa de agitación para homogeneizar.

Se colocó la solución en una jeringa de 5 ml de plástico, con diámetro de 11.99 mm, se instaló en el equipo de electrospaying programado previamente utilizando un flujo de 60 μ l/h, voltaje de 17.4 kV en el inyector, utilizando una distancia de 16 cm entre el inyector y colector, condiciones que permitieron la

formación del cono de Taylor, por consiguiente el proceso de encapsulación de extractos proteolíticos de cáscara *B. pinguin* y semilla *B. karatas* fue estable.

5.5.1 Caracterización parcial de la solución polimérica

Los valores de pH se realizaron directamente en las soluciones poliméricas con un potenciómetro (Hanna Instruments modelo HI 251) a 25°C. La densidad se determinó por el método indirecto, midiendo la masa y el volumen de las soluciones poliméricas para posteriormente calcular la densidad. La conductividad eléctrica de las soluciones poliméricas se determinó con un potenciómetro multiparamétrico (Hanna Instruments modelo HI 251) a 25°C. Para la determinación de la viscosidad se utilizó el reómetro (TA Instrument) modelo DISCOVERY HR-1, se utilizó una geometría cono-plato 2°, temperatura de 25° C y una fuerza de cillaza 50 1/s en un lapso de 5 minutos.

5.6 Propiedades evaluadas durante el almacenamiento de los encapsulados

Las propiedades que fueron determinadas por un período de cinco meses fueron, actividad proteolítica, capacidad antioxidante por los métodos FRAP y ABTS; así como en el mes cuatro se evaluó la capacidad antiinflamatoria (por las metodologías ya descritas anteriormente) además a los encapsulados de 5 meses se les evaluó su resistencia a la radiación ultravioleta UV (Efecto fotoprotector).

5.6.1 Efecto fotoprotector

Para el proceso de radiación se utilizó una lámpara Osram Ultra-Vitalux (300 W), que se ubicó a una altura de 20 cm de la superficie de las muestras a irradiar. Esta mezcla de radiación es generada por un tubo de descarga de cuarzo y un filamento de tungsteno. Se colocaron en tubos eppendorf 4 mg de extracto proteolítico de cáscara de guámara y semilla de cocuixtle sin encapsular y encapsuladas, la temperatura fue mantenida a 41 °C con la ayuda de un equipo

de enfriamiento. El intervalo del tiempo de irradiación de las muestras se estableció de 0 a 8 días, evaluándose periódicamente la actividad proteolítica específica, cada 2 días, tomando 2.6 mg de muestra y re-suspendiéndolo en 1 ml de buffer de fosfato de sodio pH 6.0, para realizar el análisis requerido (Apartado 5.5), y así observar el comportamiento de la actividad proteolítica específica conforme el aumento del tiempo de irradiación.

5.6.2 Análisis estadístico

En la etapa 1 del proyecto se aplicó un diseño estadístico 2^2 y para la etapa 2 se aplicó una prueba de medias LSD empleando el software STATISTICA 10.0 ($\alpha=0.05$)

CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de cada etapa se presentan a continuación:

Etapas I: Caracterización de los subproductos y obtención de proteasas de frutos de *B. pinguin* y *B. karatas*.

6.1 Caracterización de subproductos de *B. pinguin* y *B. karatas*

6.1.1 Análisis fisicoquímicos y composición química proximal

En el cuadro 6.1 se muestran los resultados obtenidos de los análisis fisicoquímicos de la cáscara y semilla de *B. pinguin* y *B. karatas* liofilizados, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) por especie vegetal en los parámetros analizados. En cuanto al contenido de sólidos solubles totales ($^{\circ}$ Brix) se muestran valores más altos en las cáscaras de ambas especies de 1.76 ± 0.05 g/100g y 1.56 ± 0.05 g/100g BS, para *B. pinguin* y *B. karatas* respectivamente, sin embargo, es la especie *B. pinguin* la que acumula el porcentaje más alto en su contenido de este componente.

En cuanto a los valores de pH obtenidos se muestra que es mínima la variabilidad del porcentaje entre las muestras, aun así, es la cáscara de ambas frutas las que contienen pH más bajos, con valores de 3.90 ± 0.08 para *B. pinguin* y 3.98 ± 0.02 en *B. karatas*, sin embargo el que presenta pH más bajo es *B. pinguin*. Por otra parte, el porcentaje de acidez en la cáscara de ambas frutas es donde predomina este parámetro con valores de 4.18 ± 0.28 g/100g y 3.35 ± 0.13 g/100 g ácido cítrico para *B. pinguin* y *B. karatas* respectivamente, no obstante es *B. pinguin* quien presenta el porcentaje más alto.

Cuadro 6.1 Parámetros fisicoquímicos de subproductos de *B. pinguin* y *B. karatas* g/100g BS

Parámetros Físico-químicos	<i>B. pinguin</i>		<i>B. karatas</i>	
	Cáscara	Semilla	Cáscara	Semilla
° Brix	1.76±0.05 a	0.26±0.05 c	1.56±0.05 b	0.23±0.05 c
pH	3.90±0.08 a	5.33±0.40 c	3.98±0.02 ab	4.33±0.01 b
Acidez titulable	4.18±0.28 a	0.59±0.10 c	3.35±0.13 b	0.59±0.09 c

Los valores son las medias de tres repeticiones \pm desviación estándar. Letras diferentes por fila indican diferencia significativa entre las muestras. Medias analizadas por LSD ($p < 0.05$)

Estudios sobre la caracterización fisicoquímica de los frutos de *B. pinguin* y *B. karatas* es escasa, más aún en los subproductos de los frutos de las especies mencionadas, es por ello la comparación con estudios realizados en otras especies de *bromelias*.

García-Chacón y cols., (2016) presentaron valores de sólidos solubles totales de 2.40 ± 0.1 g/100g al trabajar con cáscaras de piña, valores superiores a los encontrados en las cáscaras y semillas de ambas especies del presente trabajo. En cuanto al pH reportan valores de 4.12 ± 0.01 , levemente por encima de los valores encontrados en las cáscaras de ambas especies, pero por debajo de los valores encontrados en las semillas de la presente investigación. Las diferencias observadas se pueden atribuir a las distintas especies de *bromelias* con las que se trabajó.

Meza-Espinoza y cols., (2017) presentaron características fisicoquímicas de la pulpa de *B. pinguin* y *B. karatas* colectadas en Nayarit, México, con valores de sólidos solubles totales mayores con respecto a los datos obtenidos en la presente investigación (12.4 ± 0.14 y 16.72 ± 0.10 g/100g); mientras que al comparar los valores de pH que reportan son menores (3.67 ± 0.05 y 3.14 ± 0.03 *B.*

pinguin y *B. karatas*). Los valores que reportan para acidez titulable son menores o iguales en las cáscaras de ambas especies, ya que Meza-Espinoza y cols., (2017) reportan 2.49 ± 0.05 y 3.35 ± 0.27 en *B. pinguin* y *B. karatas*, respectivamente. No obstante al comparar ésta acidez de las pulpas con la acidez de las semillas se encuentran valores más altos. Las diferencias encontradas en estos componentes podría deberse al tipo de muestras analizadas (pulpa&subproductos).

La caracterización de los subproductos de guámara y cocuixtle en cuanto a los parámetros fisicoquímicos es de suma importancia en esta investigación, ya que de esta manera se contribuye en la generación de información, es importante porque hasta el momento los subproductos mencionados no se han caracterizado en cuanto a estos parámetros. Sin embargo también en este mismo proyecto se trabaja con extractos proteolíticos de los subproductos, donde se determina el contenido de proteína y la actividad proteolítica, los cuales no tienen ninguna relación con los análisis fisicoquímicos analizados, debido a que la extracción se realiza a un pH neutro y los sólidos solubles totales o carbohidratos que pudieran estar presentes en los extractos se eliminan durante la purificación parcial de las enzimas. No obstante como se mencionó anteriormente, analizar fisicoquímicamente los subproductos, es de suma importancia, debido a que no existe ningún estudio en cuanto a estos parámetros en subproductos de guámara y cocuixtle.

En cuanto a la composición química proximal también se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) por especie vegetal en los parámetros analizados (Cuadro 6.2). El contenido de humedad observado directamente para las cuatro muestras denota diferencias significativas. En el caso de *B. pinguin* es la cáscara quien posee mayor contenido de humedad con 2.44 g/100g BS, caso contrario con *B. karatas* donde la semilla presentó un contenido de humedad más elevado con

10.18 g/100g BS. Las diferencias de los resultados obtenidos pueden estar relacionadas con las características genéticas propias de cada especie, además relacionado con la composición del suelo de la zona donde crece la especie estudiada (Payrol y cols., 2008). Comparando los resultados con los de Moyano y cols., (2012) es mayor el contenido de humedad de la cáscara de *B. karatas* (33.12 g/100g BS) con respecto a lo obtenido en este proyecto, esto podría estar relacionado de igual manera con lo que se argumenta anteriormente, además del tratamiento de la muestra, ya que en este estudio se utilizaron muestras liofilizadas.

El contenido de cenizas no presentó diferencia significativa entre las semillas de *B. pinguin* y *B. Karatas*, siendo lo contrario en la cáscara de ambos frutos, donde es evidente la diferencia ya que la cáscara *B. pinguin* presentó una concentración de 12.60 ± 0.02 g/100g y la de *B. karatas* 5.07 ± 0.18 g/100g BS. Los resultados de la cáscara de *B. karatas* son semejantes con los de Moyano y cols., (2012) ya que obtuvieron 5.92 g/100g BS en contenido de cenizas.

El contenido de extracto etéreo fue similar entre las cáscaras de ambas especies y las semilla de *B. karatas*, destacando la semilla de *B. pinguin* con el mayor contenido de extracto etéreo 5.28 ± 0.37 g/100g BS. Los valores en la cáscara de *B. karatas* en base seca son mayores a los reportados con Moyano y cols., (2012) que reportan 0.37g/100g BS, esto podría deberse a que se utilizó el método soxhlet donde la temperatura pudo variar y por lo tanto el número de rotaciones que se presentaron durante el proceso, ya que en cada rotación se obtiene determinada cantidad de grasa, lo que pudo provocar variabilidad en los resultados.

Las cáscaras de ambas frutas tienen el mayor contenido de carbohidratos con valores de 28.75 ± 0.63 g/100g BS para *B. pinguin* y 42.98 ± 0.37 g/100g BS en *B. karatas*. Para las semillas, el valor preponderante lo presenta la semilla de *B. pinguin* con 7.48 ± 0.22 . El contenido de carbohidratos en la cáscara de *B. karatas*

son menores al que reportaron Moyano y cols., (2012) 50.41 g/100g BS. La variación de carbohidratos puede corresponder a la hidrólisis de carbohidratos poliméricos que pueda tener cada muestra. Lara y cols., (2007) concluyeron que sus muestras de guayaba con cáscara y menos maduras presentaron mayor contenido de fibra, debido a que la piel presenta gran cantidad de carbohidratos poliméricos (celulosa, hemicelulosa, sustancias pépticas y lignina) y durante la maduración se presenta la degradación de estos (además del almidón); de lo anterior se deriva un aumento en el contenido de azúcares. La degradación de carbohidratos poliméricos, así como otras reacciones que ocurren durante el proceso madurativo, son sólo posibles debido a la actividad enzimática.

Al analizar la fracción de proteína se encuentran diferencias significativas por subproductos ($p < 0.05$), donde predomina la concentración de este componente en la semilla de las dos frutas con 6.31 ± 0.19 g/100g BS en *B. pinguin* y 6.32 ± 0.47 g/100g BS en *B. karatas*. Comparado los resultados de la cáscara de *B. karatas* en base seca resulta similar que los resultados de Moyano y cols., (2012), 2.12 g/100g BS. La alta concentración de proteína en las semillas de ambas especies podría deberse a la cantidades de cuerpos proteicos que contienen tanto el embrión como el endospermo maduro. El contenido de proteínas de reserva en el embrión y células vegetativas de plantas, permiten el desarrollo de la maduración y germinación de éstas, ya que son una de las principales fuentes de carbono, nitrógeno y azufre para el subsiguiente crecimiento y desarrollo (Jiménez y cols., 2007).

El contenido de fibra dietética es estadísticamente diferente entre las cáscaras de ambas especies, no así, en las semillas de ambos frutos donde se encontró mayor contenido de este componente. Los valores encontrados para las cáscaras fueron 23.64 ± 0.78 para *B. pinguin* y 26.32 ± 0.97 para *B. karatas*. El contenido de fibra dietética mayor en las semillas que en cáscaras de ambas especies se le puede atribuir que estas partes del fruto poseen mayor contenido de algunos componentes como celulosa, polisacáridos no celulósicos como hemicelulosa,

sustancias pécticas, gomas, mucílagos y lignina, que es parte del material vegetal resistente la digestión enzimática (Dhingra y cols., 2011).

Cuadro 6.2 Composición química proximal de subproductos de *B. pinguin* y *B. karatas* g/100g BS

Parámetros	<i>B. pinguin</i>		<i>B. karatas</i>	
	Cáscara	Semilla	Cáscara	Semilla
Humedad	2.44±0.06a	1.44±0.30c	4.78±0.02b	10.18±0.05d
Cenizas	12.60±0.02a	1.01±0.03c	5.07±0.18b	1.18±0.06c
Extracto etéreo	3.66±0.61a	5.28±0.37b	3.95±0.70a	3.21±0.37a
Carbohidratos	28.75±0.63a	7.48±0.22c	42.98±0.37b	3.35±0.35d
Proteína	2.71±0.16a	6.31±0.19b	2.67±0.40a	6.32±0.47b
Fibra dietética total	23.64±0.78a	29.61±0.08c	26.32±0.97b	29.99±0.99c

Los valores son las medias de tres repeticiones ± desviación estándar. Letras diferentes por fila indican diferencia significativa entre las muestras. Medias analizadas por LSD ($p < 0.05$)

6.2 Obtención de proteasas de subproductos de *B. pinguin* y *B. karatas*

En esta etapa se obtuvieron proteasas prepurificadas de los subproductos de frutos de *B. pinguin* y *B. karatas*, y a los extractos proteolíticos se les determinó la concentración de proteína, actividad proteolítica, capacidad antioxidante y antiinflamatoria.

6.2.1 Concentración de proteína y actividad proteolítica de subproductos de *B. pinguin* y *B. karatas*

La concentración de proteína y actividad proteolítica específica de las proteasas parcialmente purificadas de cáscaras y semillas de *B. pinguin* y *B. karatas* se muestran en el cuadro 6.3. En general los subproductos de la especie *B. pinguin* poseen mayor concentración de proteína y actividad proteolítica específica que la

especie *B. karatas*, además las semillas poseen mayor concentración de proteína en ambas especies.

Los subproductos que presentaron mayor actividad proteolítica fueron, la cáscara para *B. pinguin* y la semilla para *B. karatas*, con valores de 10.35 ± 0.97 UT/mg de proteína (Unidades de Tirosina/mg de proteína) y 8.89 ± 0.28 UT/mg de proteína respectivamente, con valores de concentración de proteína de 591.60 ± 8.62 $\mu\text{g/ml}$ para *B. pinguin* y 531.46 ± 8.77 $\mu\text{g/ml}$ para *B. karatas*.

Cuadro 6.3 Concentración de proteína y actividad proteolítica específica de subproductos de *B. pinguin* y *B. karatas*

Parámetro	<i>B. pinguin</i>		<i>B. karatas</i>	
	Cáscara	Semilla	Cáscara	Semilla
Proteína ($\mu\text{g/ml}$)	$591.60 \pm 8.62a$	$655.06 \pm 12.39c$	$368.06 \pm 11.66b$	$531.46 \pm 8.77d$
Actividad proteolítica específica (UT/mg de proteína)	$10.35 \pm 0.97a$	$8.72 \pm 0.391.40c$	$4.29 \pm 0.26b$	$8.89 \pm 0.28c$

Los valores son las medias de tres repeticiones \pm desviación estándar. Letras diferentes por fila indican diferencia significativa entre las muestras. Medias analizadas por LSD ($p < 0.05$)

Estudios sobre la caracterización en cuanto a la concentración de proteína y actividad proteolítica específica de los extractos enzimáticos de subproductos de *B. pinguin* y *B. karatas* hasta el momento no existe, es por ello la comparación con estudios realizados con extractos de los frutos de otras especies u otras partes del fruto. Meza-Espinoza y cols., (2017) muestran actividades proteolíticas específicas más altas comparado con la presente investigación, con valores de 22.83 ± 0.62 y 10.00 ± 1.71 UT/mg de proteína para *B. pinguin* y *B. karatas* respectivamente, con concentraciones de proteína de 50 $\mu\text{g/ml}$ y 60 $\mu\text{g/ml}$, más es importante hacer notar que dichos investigadores trabajaron con la pulpa de la fruta, por lo que las diferencias pueden ser atribuidas a esta razón.

Por otro lado García-Magaña y cols., (2018) encontraron una actividad proteolítica específica de 43.58 UT/mg, para *B. pinguin* y 21.93 UT para *B. karatas* al trabajar con la pulpa de dichos frutos, además Payrol y cols., (2008), reportan una actividad proteolítica específica de 7.11 Ucas/mg y una concentración de proteína de 1730 µg /ml en proteasas parcialmente purificadas de *B. pinguin* precipitadas con etanol.

Las diferencias en la actividad proteolítica específica se debieron probablemente al hecho de que cada especie de *Bromeliaceae* posee proteasas diferentes, pueden ser endo o exopeptidasas (Beynon y Bond, 2001), presentar diferente afinidad por el sustrato, efecto por la temporada de colección de frutas y el suelo, (Meza-Espinoza y cols., 2017), además de estar influenciadas por la concentración de proteína que presentaron, cada muestra es diferente por lo que algunas pueden presentar proteínas que realmente son enzimas y otras no, por consiguiente la actividad proteolítica específica de los extractos proteolíticos es distinta.

En base a la actividad proteolítica específica (Cuadro 6.3) se eligieron los subproductos que presentaron mayor actividad proteolítica específica de cada especie para ser encapsulados.

Etapas II: Encapsulación de proteasas obtenidas del subproducto con mayor actividad proteolítica y evaluación de algunas propiedades durante su almacenamiento.

En base a los resultados obtenidos en la etapa anterior, se seleccionaron los extractos proteolíticos de cáscara de *B. pinguin* y semillas de *B. karatas*, para su encapsulamiento.

En el Cuadro 6.4 se muestran los resultados de la caracterización parcial de las soluciones poliméricas utilizadas para encapsular por el método de electroespraying, en donde se observó un aumento de pH al introducir ambos

extractos proteolíticos, el cambio observado pudo deberse al buffer fosfato de sodio (pH 6.0) en la que estaban disueltos los extractos proteolíticos, ya que el pH utilizado fue de 6.00, considerando que estas proteasas tienen un pH óptimo de 6.0-8.0 (Meza-Espinoza y cols., 2017).

En cuanto a la densidad se encontró una disminución de la misma en las soluciones poliméricas al introducir ambos extractos proteolíticos, esta disminución se podría atribuir a que las proteasas de la familia de las bromelias presentan densidades más bajas, tal es el caso de la bromelina de la piña que tiene una densidad de aproximadamente 600 kg/m^3 (GUINAMA 90729-Bromelaina), además al analizar las densidades de los extractos proteolíticos de la cáscara de *B. pinguin* y semilla de *B. karatas* presentan 404 kg/m^3 y 368 kg/m^3 respectivamente y por tanto la adición de los extractos proteolíticos podría conducir a la disminución de la densidad de la solución sin extracto.

Referente a la conductividad, al incluir los extractos proteolíticos a la solución polimérica se observó un incremento en este parámetro, la variación pudo deberse a la característica salina del buffer fosfato de sodio en el que se encuentran contenidas las proteasas de estudio; esto coincide con lo reportado por Arango y Garcés, (2009) quienes mencionan que la presencia de algunas sales tales como NaCl o CaCl_2 generan un aumento en la conductividad del agua residual, y en este caso el aumento en la conductividad de la solución favorece el proceso de encapsulación. En el parámetro de viscosidad no se encontró estadísticamente diferencia significativa entre las soluciones poliméricas analizadas.

Cuadro 6.4 Caracterización parcial de las soluciones poliméricas

Parámetro	Soluciones poliméricas		
	Solución sin extracto proteolítico	Solución con extracto proteolítico de <i>B. pinguin</i>	Solución con extracto proteolítico de <i>B. karatas</i>

pH	5.56±0.00a	5.76±0.00b	5.81±0.00c
Densidad (kg/m ³)	1065.96±0.15a	1055.53±0.45b	1054.3±0.02c
Conductividad (µS/cm)	96.66±0.28a	232.9±0.60b	236.4±0.70c
Viscosidad (Pa.s)	0.0151±0.00a	0.0157±0.00a	0.0158±0.00a

Los valores son las medias de tres repeticiones ± desviación estándar. Letras diferentes por fila indican diferencia significativa entre las muestras (p<0.05)

6.2.2 Concentración de proteína y actividad proteolítica de extractos proteolíticos encapsulados de subproductos de *B. pinguin* y *B. karatas*

En el cuadro 6.5 se muestra la concentración de proteína y actividad proteolítica específica del extracto proteolítico de la cáscara de *B. pinguin* y semilla de *B. karatas*, antes y después de la encapsulación y durante su almacenamiento.

En ambos extractos proteolíticos se encontró una reducción en la concentración de proteína con respecto a los extractos proteolíticos sin encapsular, presentando mayor concentración de proteína, la cáscara de *B. pinguin* que la semilla de *B. karatas*, con valores de 509.46±1.55 µg/ml y 469.00±3.30 µg/ml respectivamente.

En los extractos proteolíticos encapsulados se encontraron actividades proteolíticas específicas levemente disminuídas con respecto a los extractos sin encapsular, en los extractos proteolíticos de la cáscara de *B. pinguin* se encontró una actividad proteolítica específica de 9.91±0.73 UT/mg de proteína, mientras que en *B. karatas* se encontró 8.53±0.77 UT/mg de proteína. Esta reducción con respecto a las enzimas sin encapsular involucra de un 95-96% de actividad proteolítica específica, por lo que solo en promedio el 5% fue perdida la actividad. Esta disminución es menor que la reportada por Moreno-Cortez y cols., (2015) que al encapsular la enzima papaína en poly (vinilo alcohol) por el método del

electrospinning, reportaron que la actividad catalítica de la enzima encapsulada fue de 88% con respecto a la enzima libre, por lo que se perdió un 12% de actividad. Por otra parte de forma general se puede observar que la proteasa encapsulada fue perdiendo del 1 al 2% de actividad por mes, lo que permite considerar que se tiene una alta estabilidad.

Cuadro 6.5 Concentración de proteína y actividad proteolítica específica de los extractos proteolíticos de subproductos de *B. pinguin* y *B. karatas* en almacenamiento

Condiciones de la proteasa		Concentración de proteína		Actividad proteolítica específica	
		(µg/ml)		(UT/mg)	
		Cáscara	Semilla	Cáscara	Semilla
		<i>B. pinguin</i>	<i>B. karatas</i>	<i>B. pinguin</i>	<i>B. karatas</i>
Sin encapsular		591.60±8.62a	531.46±8.77a	10.35±0.97a	8.89±0.28a
Tiempo de encapsulación de las Proteasas (meses)	0	509.46±1.55b	469.00±3.30b	9.91±0.73a	8.53±0.77a
	1	507.46±0.83b	467.06±0.64b	9.78±0.29a	8.23±0.80a
	2	505.41±0.52b	465.58±0.76b	9.30±0.38a	7.65±0.11a
	3	499.58±0.52c	457.05±0.26c	8.38±0.54b	6.97±0.50b
	4	498.25±0.90c	456.16±0.87c	8.26±0.31c	6.87±0.27c
	5	496.16±0.80d	454.25±0.75d	8.10±0.41d	6.70±0.21d

Los valores son las medias de tres repeticiones ± desviación estándar. Letras diferentes por columna indican diferencia significativa entre las muestras ($p < 0.05$)

6.3 Determinación de la capacidad antioxidante de las proteasas con mayor actividad proteolítica específica por el método FRAP y ABTS.

6.3.1 FRAP

En el cuadro 6.6 se muestran los datos de la capacidad antioxidante en los extractos proteolíticos de la cáscara de *B. pinguin* y semilla de *B. karatas* antes y después de encapsular, además de su estabilidad durante 5 meses.

La mayor actividad quelante de metales de las proteasas sin encapsular se presenta en los extractos de cáscara de *B. pinguin* ($3.46 \pm 0.05 \mu\text{M ET/g}$). No obstante, después de encapsular la capacidad antioxidante por este método se reduce en aproximadamente 40% en ambos extractos proteolíticos. Esta disminución podría deberse a que durante el proceso de encapsulación se provoque un cambio en la estructura de la proteína y se ha reportado que podría existir alguna relación con la capacidad antioxidante de los extractos proteolíticos. Las proteínas tienen potencial como antioxidantes en alimentos porque pueden inhibir la oxidación de lípidos a través de múltiples vías que incluyen inactivación de especies reactivas de oxígeno, eliminación de radicales libres, quelación de metales de transición pro-oxidativos, reducción de hidroperóxidos y alteración de las propiedades físicas de los sistemas alimentarios (Elías y cols., 2008).

Por otra parte Guo y cols., (2003) reportaron por el método FRAP en extractos de cáscaras de piña una capacidad antioxidante de $20 \mu\text{M ET/g}$, y de $8 \mu\text{M ET/g}$ para extractos de pulpa, estos autores atribuyen la capacidad antioxidante que encontraron al contenido de vitamina C, ya que en los análisis químicos sobresale su fuerte poder reductor.

Ding y Syazwani, (2016) reportan capacidades antioxidantes alrededor de $16 \mu\text{M ET/g}$ en extractos acuosos de piña, no obstante este resultado lo atribuyen

principalmente al contenido fenólico. Los valores que se reportan están por encima de lo encontrado en el presente trabajo, esto podría deberse principalmente a las especies de *bromelias* con las que se trabajó, además del proceso de extracción. En el cuadro 6.6, después de la encapsulación se observa una disminución en la capacidad antioxidante por el método FRAP de los extractos proteolíticos, encontrando valores de $3.46 \pm 0.05 \mu\text{M ET/g}$ y $1.98 \pm 0.06 \mu\text{M ET/g}$ para *B. pinguin*; 1.59 ± 0.30 y 0.99 ± 0.05 para *B. karatas*, antes y después de la encapsulación respectivamente. No obstante se puede observar que la mayor actividad quelante de metales se presenta en los extractos proteolíticos encapsulados de cáscara de *B. pinguin* ($1.98 \pm 0.06 \mu\text{M ET /g}$), mientras que en la semilla de *B. karatas* resalta que la capacidad antioxidante del encapsulado se mantiene estable sin diferencia significativa hasta los 2 meses de almacenamiento.

Cuadro 6.6 Capacidad antioxidante por método FRAP y ABTS de extractos proteolíticos de la cáscara de *B. pinguin* y semilla de *B. karatas* en almacenamiento.

Condiciones de la proteasa	Método FRAP μM ET/g		Método ABTS μM ET/g		
	Cáscara <i>B. pinguin</i> Concentración	Semilla <i>B. karatas</i> Concentración	Cáscara <i>B. pinguin</i> Concentración	Semilla <i>B. karatas</i> Concentración	
Sin encapsular	3.46±0.05a	1.59±0.30a	72.12±0.02a	69.00±0.10a	
Tiempo de encapsulación de las Proteasas (meses)	0	1.98±0.06b	0.99±0.05b	43.50±0.03b	41.23±0.34b
	1	1.93±0.00b	0.92±0.00b	42.44±0.01b	40.09±0.11b
	2	1.69±0.01b	0.69±0.01b	39.78±0.00c	37.08±0.01c
	3	1.39±0.01c	0.31±0.04c	34.57±0.05d	32.61±0.03d
	4	1.25±0.01d	0.21±0.04d	34.28±0.01d	32.41±0.00d
	5	1.19±0.01d	0.19±0.04d	29.78±0.01d	27.80±0.00d

Los valores son las medias de tres repeticiones ± desviación estándar. Letras diferentes por columna indican diferencia significativa entre las muestras (p<0.05)

6.3.2 ABTS

Se empleó el método propuesto por Re y cols., (1999), el cual se basa en la capacidad de una sustancia antioxidante para capturar el radical ABTS•+ (ácido 2,2' azinobis-3etilbenzotiazolina-6-sulfónico) lo cual provoca un descenso en la absorbancia a 730 nm. Los resultados obtenidos para las muestras sin encapsular no presentan diferencias significativas entre los extractos de cáscara de *B. pinguin* y semilla de *B. karatas* con valores de $72.12 \pm 0.02 \mu\text{M ET/g}$ y $69.00 \pm 0.10 \mu\text{M ET/g}$ respectivamente (Cuadro 6.6).

Referente a los encapsulados, se observa una reducción en la concentración de $\mu\text{M ET/g}$ por el método ABTS de los extractos proteolíticos encapsulados de subproductos de *B. pinguin* y *B. karatas* respecto a los no encapsulados; esta reducción podría deberse a la reducción de la concentración de proteína (Elías y cols., 2008) y la actividad proteolítica de los extractos de cáscara de *B. pinguin* y *B. karatas*

No obstante durante el almacenamiento los encapsulados no mostraron una disminución significativa en la capacidad antioxidante hasta los 2 meses de almacenamiento; en este punto es importante considerar que Kuskoski y cols. (2005), reportan una capacidad antioxidante en extracto de piña por este método, inferior a los valores encontrados en la presente investigación ($2.4 \pm 0.3 \mu\text{M ET/g}$), por lo que se podría considerar, en base a Elías y cols (2008), que la presencia de proteasas en los extractos de los encapsulados sean los responsables de esta capacidad antioxidante superior.

Otros autores reportan capacidades antioxidantes en extractos de bromelias tanto *karatas* como *pinguin*, tal es el caso de Payrol y cols., (2001) que evidenciaron la presencia cualitativa de antioxidantes en *B. pinguin* tales como compuestos fenólicos (taninos y flavonoides), terpenos, saponinas y ácidos grasos, mientras que Moyano y cols., (2012) evidenciaron en *B. karatas* la presencia de flavonoides, terpenos y cumarinas, tanto en la pulpa de frutos verdes como en frutos maduros, no obstante, estos autores relacionan la capacidad antioxidante encontrada con compuestos fenólicos.

De manera general se encontró una mayor capacidad antioxidante en los extractos proteolíticos de cáscara de *B. pinguin*, tanto por el método FRAP como el ABTS; los valores de FRAP fueron menores en comparación a los valores de ABTS, la diferencia sugiere que los compuestos antioxidantes presentes en los extractos enzimáticos de los subproductos de *B. pinguin* y *B. karatas* son altamente hidrofílicas los cuales son más sensibles a la técnica ABTS (Zapata y cols., 2013), además por el método ABTS se puede medir la capacidad antioxidante de los componentes lipofílicos de una muestra; y en el caso de los extractos estudiados se puede atribuir la capacidad antioxidante presentada al contenido de proteínas

6.4 Actividad antiinflamatoria por el ensayo ciclooxygenasa

En el cuadro 6.7 se muestran los resultados de la actividad antiinflamatoria de los extractos proteolíticos de cáscara de *B. pinguin* y semilla de *B. karatas*, sin encapsular y encapsuladas mediante el ensayo de inhibición de la ciclooxygenasa. Ambas muestras de extractos proteolíticos se evaluaron tanto encapsuladas y no encapsuladas, ajustando las muestras (w/v) a 2.6 mg/mL, esta concentración fue la empleada en los ensayos de la actividad proteolítica específica, sin embargo las concentraciones de extractos proteolíticos fueron distintas, 26,000ng/mL en sin encapsular y 8.4ng/mL en las encapsuladas.

En los extractos proteolíticos sin encapsular se observó que no existe diferencia significativa entre las dos fuentes de proteasas contra la COX1 y COX2. Específicamente en *B. pinguin* contra COX1 mostró un porcentaje de inhibición de 40.10 ± 1.80 , mientras que *B. karatas* presentó 35.33 ± 7.56 , respecto a COX2 *B. pinguin* presentó 32.71 ± 0.09 y *B. karatas* 32.27 ± 1.72 .

Al evaluar los extractos proteolíticos encapsulados, contra COX1 se observó diferencia significativa entre la fuente de proteasas, obteniendo una mayor actividad en las obtenidas de *B. pinguin*, con un $10.78 \pm 0.16\%$ de inhibición, mientras que *B. karatas* presentó $9.23 \pm 0.72\%$. En COX2 no se observó diferencia

significativa entre *B. pinguin* y *B. karatas* ya que presentaron porcentajes de inhibición de $6.19 \pm 2.17\%$ y $5.52 \pm 1.9\%$ respectivamente.

La inhibición de formación de prostaglandinas que presentaron ambos extractos proteolíticos se le podría atribuir, tanto a fragmentos de péptidos y proteasas que están contenidas en los extractos y en los encapsulados, Ramadwa y cols., (2017), al evaluar el extracto crudo de funtunia africana encontraron un porcentaje de inhibición de prostaglandinas de 59.7 ± 1.4 contra la COX1 y 54.3 ± 0.3 contra la COX2, en donde mencionan que los constituyentes de un extracto vegetal pueden tener un efecto inhibitorio en el ensayo desnaturizando la enzima o actuando sobre el grupo protésico inactivando a sí la enzima. Además, Oliva-Hernández y cols., (2012) encontraron un efecto inhibitorio en la ciclooxigena 2 a partir del extracto clorofórmico de hojas de *Allophylus cominia*.

Se observó en los encapsulados que aún al utilizar menor concentración de extractos proteolíticos de cáscara de *B. pinguin* y semilla de *B. karatas*, se requiere menor cantidad que los extractos proteolíticos sin encapsular, para inhibir el mismo porcentaje de formación de prostaglandinas. El efecto de los extractos proteolíticos sin encapsular y encapsulados sobre la actividad contra ambas enzimas (COX1 y COX2) puede ser atribuido a que en los extractos sin encapsular se tienen tanto proteasas como fragmentos de péptidos, mientras cuando ya están encapsulados lo que sucede es que los fragmentos de péptidos pueden estar quedando atrapados en los fructanos de agave y las proteasas son liberadas.

Cuadro 6.7 Actividad antiinflamatoria de extractos proteolíticos de cáscara de *B. pinguin* y semilla de *B. karatas* sin encapsular y encapsuladas

Condición de la proteasa	Concentración de muestra	Concentración de enzima*	Actividad antiinflamatoria Cáscara <i>B. pinguin</i>		Semilla <i>B. karatas</i>	
			% Inhibición COX-1	% Inhibición COX-2	% Inhibición COX-1	% Inhibición COX-2
Sin encapsular	2.6 mg/mL	26,000 ng/mL	40.10±1.80a	32.71±0.09b	35.33±7.56a	32.27±1.72b
Encapsulada	2.6 mg/mL	8.4 ng/mL	10.78±0.16a	6.19±2.17c	9.23±0.72b	5.52±1.96c

Los valores son las medias de dos repeticiones ± desviación estándar. Letras diferentes por fila indican diferencia significativa entre los tratamientos. Medias analizadas por LSD ($p < 0.05$).

*Ambos tratamientos partieron de un peso de muestra de 2.6 mg/mL (w/v)

6.5 Efecto de radiación UV sobre la actividad proteolítica específica de extractos proteolíticos

En el cuadro 6.8 se muestra el cuadro del efecto de la radiación UV sobre la actividad proteolítica específica de los extractos proteolíticos sin encapsular y encapsuladas.

Existen reportes donde es evidente que la radiación afecta la actividad enzimática, por ejemplo, Samaniego y cols., (2014) al estudiar el efecto de la radiación ultravioleta en la actividad enzimática de la polifenoloxidasas y peroxidasa del jugo de dos variedades de naranjilla, encontraron que la actividad de la peroxidasa fue afectada al someter a radiación UV por 8 h, también la polifenoloxidasas en el zumo de la naranjilla híbrida se logró inactivar hasta un 45.8% en 4.5 h de radiación y la enzima de la naranjilla dulce se redujo en un 34% en 2.5 h de radiación UV.

En este trabajo interesa preservar la actividad enzimática del extracto proteolítico de los subproductos de *B. pinguin* y *B. karatas* con el encapsulamiento, y como se se puede observar en el cuadro 6.8, existe una disminución notoria en la actividad enzimática de los extractos proteolíticos sin encapsular al someterse a la radiación de hasta un 8 y 9 % en cáscara de *B. pinguin* y semilla de *B. karatas*, respectivamente; mientras que en los encapsulados la actividad proteolítica específica es mínima la disminución del 2 al 3%, por lo que la encapsulación tiene un efecto protector (Parra, 2011).

Cuadro 6.8 Efecto de la radiación UV sobre la actividad proteolítica específica de los extractos proteolíticos de cáscara de *B. pinguin* y semilla de *B. karatas* encapsuladas por 4 meses.

Días en radiación UV	Actividad proteolítica específica (APE) (UT/mg)							
	<i>Cáscara B. pinguin</i>				<i>Semilla B. karatas</i>			
	Sin encapsular	% APE	Encapsulada	% APE	Sin encapsular	% APE	Encapsulada	% APE
0	5.64±0.04a	100	8.09±0.04a	100	3.79±0.02a	100	6.72±0.02a	100
2	5.56±0.04a	98.62	8.04±0.02a	99.40	3.69±0.03a	97.36	6.62±0.02a	99.92
4	5.41±0.04b	96.04	7.98±0.02a	98.70	3.59±0.04c	94.64	6.57±0.02a	98.34
6	5.30±0.04c	94.03	7.96±0.04b	98.38	3.60±0.03c	95.12	6.54±0.02b	98.01
8	5.19±0.06d	92.07	7.85±0.04c	97.08	3.47±0.04d	91.61	6.46±0.02c	96.73

Los valores son las medias de tres repeticiones ± desviación estándar. Letras diferentes por columna indican diferencia significativa entre las muestras. Medias analizadas por LSD (p<0.05)

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

- ❖ Los subproductos de *B. pinguin* y *B. karatas* son una fuente natural rica en proteasas, las cuales presentan actividades proteolíticas específicas interesantes, mostrando mayor actividad la cáscara para *B. pinguin* y la semilla para *B. karatas*.
- ❖ La encapsulación por la técnica del electrospraying permite conservar la actividad proteolítica específica hasta por 5 meses, con una reducción máxima de 18% y 21 % para la cáscara de *B. pinguin* y la semilla de *B. karatas*, respectivamente.
- ❖ Las proteasas parcialmente purificadas de la cáscara de *B. pinguin* y la semilla de *B. karatas* presentan capacidades antioxidantes de 1.98 μM ET/g y 1.59 μM ET/g para FRAP y de 72.12 μM ET/g y 69.00 μM ET/g para ABTS respectivamente.
- ❖ En las proteasas encapsuladas, aunque se observa disminuída la concentración de μM ET/g por los métodos FRAP y ABTS, se observa una aceptable capacidad antioxidante por el método ABTS, comparado con extractos de piña.
- ❖ Los extractos proteolíticos de cáscara de *B. pinguin* y semilla de *B. karatas* sin encapsular presentan actividad de 32.71% y 32.27% respectivamente a concentraciones 26,000 ng/ml; en los encapsulados de la cáscara de *B. pinguin* y semilla de *B. karatas* presentan una actividad antiinflamatoria del 6.19% y 5.52% repectivamente, a concentraciones de 8.4 ng/ml, por lo que su potencial antiinflamatorio es mejor.
- ❖ La encapsulación después de 4 meses de los extractos proteolíticos de cáscara de *B. pinguin* y semilla de *B. karatas* con fructanos de agave por

la técnica del electrospraying protege de las radiaciones UV, manteniendo la actividad proteolítica específica en un 2.92% y 3.27% repectivamente, a los 8 días de radiación.

CAPÍTULO 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez-Parrilla, E., De LA Rosa, L., Legarreta, P., Saenz, L., Rodrigo-Gacía, J., González-Aguilar, G. 2010. Daily consumption of apple, pear and orange juice differently affects plasma lipids and antioxidant capacity of smoking and nonsmoking adults. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 61(4):368-380
- Arango, A., y Garcés, L. F. 2009. Influencia de la conductividad eléctrica en la electrocoagulación de aguas residuales de la industria láctea. *Producción+limpia*. Vol.4, No. 2.
- Bansode, D. S., y Chavan M. D. 2013. Evaluation of antimicrobial activity and phytochemical analysis of papaya and pineapple fruit juices against selected enteric pathogens. *International Journal of Pharma and Bio Scienses*. 4(2): (B) 1176-1184.
- Bastos, D., Araujo, K., y Leao, M. 2009. Ascorbic acid retaining using a new calcium alginate-capsul based edible film. *Journal of Microencapsulation* 26(2): 97-103.
- Bhushani, J. A. y Anandharamakrishnan, C. 2014. Electrospinning and electro spraying techniques: potential food based applications. *Trends in Food Science y Technology*. XX: 1-13.
- Benzie I., Strain J. 1996. The ferric reducing ability of Plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239(1):70-76.
- Beynon R., Bond J. 2001. Proteolytic Enzymes: A practical approach. Tercer edición. Oxford University Press. New York, Estados Unidos.
- Botero, M. L., Ricaurte, S. C., Monsalve, C. E. y Rojano B. 2007. Capacidad reductora de 15 frutas tropicales. *Scientia et Technica* Año XIII. N° 33.
- Bradford, M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

- Carvajal, C., Márquez, M., Pérez A. T., Chávez, M. A., y Hernández, M. 2010. Caracterización cinética de un preparado semipurificado de bromelina para uso antitumoral. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*: 15 (2): 27-41.
- Castillo, L., Robert, M., Larqué, A., y Higuera, I. 2010. CICY: Treinta años de labor científica y educativa. *Centro de investigación científica de Yucatán*, A.C. Yucatán, México.
- Cerrato, L. 2013. Panorama mundial de la Piña. *Programa Nacional de Desarrollo Agroalimentario*.
- Cian, R.E., Vioque, J., and Drago, S.R. 2015. Structure–mechanism relationship of antioxidant and ACE I inhibitory peptides from wheat gluten hydrolysate fractionated by pH. *Food Research International*, 69, 216-223.
- Champagne, C., y P. Fustier. 2007. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology* 18(2): 184-190.
- Coelho, D. F., Silveira, E., y Basile, E. 2014. Purification Processes and Market Potential of Bromelain in Brazil. *J. Chem. Chem. Eng.* (8): 882-888.
- Dhingra, D., Michael, M., Rajput, H. y Patil, R. T. 2011. Dietary fibre in foods: a review. *J Food Sci Technol.* 49(3): 255-266.

- Dhingra, D., Michael, M., Rajput, H., y Patil, R. T. 2001. Dietary fibre in foods: a review. *Association of food scientists & technologists*. 49(3): 255-266.
- Ding, P. y Syazwani, S. 2016. Physicochemical quality, antioxidant compounds and activity of MD-2 pineapple fruit at five ripening stages. *International food research journal*. 23(2): 549-555.
- Drosou, C. G., Krokida, M. K., y Biliaderis, C. G. 2017. Encapsulation of Bioactive Compounds Through Electrospraying/Electrospraying and Spray Drying: A Comparative Assessment of Food Related Applications. *Drying Technology*. Vol. 35. No 2, 139-162.
- Elías, R. J., Kellerby, S. S. y Decker, E. A. 2008. Antioxidant activity of protein and peptides. *Critical reviews in food science and nutrition*. 48: 430-441.
- Elías, R. J., Kellerby, S. S., y Decker, E. A. 2008. Antioxidante activity of proteins and peptides. *Critical reviews in food science and nutrition*. 48: 430-441.
- Errasti, M., Caffini, N., Pelzer, L., y Rotelli, A. 2013. Anti-inflammatory Activity of *Bromelia hieronymi*: Comparison with Bromelain. *Planta médica*; 79: 207-213.
- Espejo-Serna, A., López Ferrari, A. R., y Ramírez Morillo, I. 2010. *Bromeliaceae. Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes* 1-3: 8-14.
- Espejo-Serna, A., López-Ferrari, A. R., Martínez-Correa, N., y Pulido-Esparza, V. 2007. *Bromeliad* flora of Oaxaca, Mexico: richness and distribution. *Acta Botánica Mexicana*, núm. 81, pp. 71-147.
- Fuchs, M. C., Turchiuli, M. B., Cuvelier, M., Ordonnaud, C., Peyrat, M., y Dumoulin, E. 2006. Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidized bed agglomeration. *Journal of Food Engineering* 75(1): 27-35.
- Gallegos, S., Chel, L., Corzo, L.J., y Matínez, A.L. (2013). Péptidos con actividad antioxidante de proteínas vegetales. En M. Segura Campos, L. Chel Guerrero & D. Betancur Ancona (Eds.), *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias* (pp. 111.122). Barcelona: OmniaScience.

- García-Chacón, J., Castaño, M. P. y Osorio, C. 2016. Caracterización fisicoquímica de cáscaras de mango (*Mangifera indica* L.), piña (*Ananas comosus*) y banano (*Musa paradisiaca*) como material de partida para alimentos biofuncionales. *Agronomía Colombiana*. 34: S911-S913.
- García-Magaña, M. L., González-Borrayo, J., Montalvo, E., Rudiño-Piñera, E., Sáyago-Ayerdi, S. G., y Salazar-Leyva, J. A. 2018. Isoelectric focusing, efecto of reducing agents and inhibitors: partial characterization of proteases extracted from *Bromelia karatas*. *Applied biological chemistry*. 61:459-467.
- Garcidueñas, J. A. 2013. Caracterización morfológica y moleculares de piña *Ananas comosus* (L.) híbrido MD-2 y su establecimiento in vitro. Universidad Autónoma de Chapingo, Chapingo, México.
- Gaspani, L., Limioli, E., Ferrario, P., y Bianchi, M. 2002. In vivo and in vitro of Bromelain on PGE2 and SP concentrations in the inflammatory exudate in Rats. *Pharmacology*. 65:83-86.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A. y Saurel, R. 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*. 40: 1107-1121.
- Gómez-Mascaraque, L. G., y López-Rubio, A. 2015. Protein-based emulsion electrospayed micro- and submicroparticles for the encapsulation and stabilization of thermosensitive hydrophobic bioactives. *Journal of Colloid and Interface Science*.
- González, R. N., Badillo, C. J., Aranda, B. J. y Oliver, S. M. 2011. Production of plant proteases *in vivo* and *in vitro*-A review. *Biotechnology Advances journal* 29(6): 983-996.
- Ficha técnica de la bromelina: (GUINAMA 90729-Bromelaina).
- Guo, C., Yang, J., Wei, J., Li, Y., Xu, J. and Jiang, Y. 2003. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition Research*. 23:1719-1726.

- Hale, L. P., Greer, P. K., Trinh, C. T. y Gottfriend, M. R. 2005. Treatment with oral bromelain decreases colonic inflammation in the IL-10-deficient murine model of inflammatory bowel disease. *Clinical Immunology*. 116: 135 – 142.
- Harris, R. C., y Zhang, M. 2011. Cyclooxygenase metabolites in the kidney. *Comprehensive Physiology*. Volumen 1.
- Hemalatha, R. y Anbuselvi, S. 2013. Physicochemical constituents of pineapple pulp and waste. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 5(2): 240-242.
- Hernández, M., Carvajal, C., Márquez, M., Báez, R., Morris, H., Santos, R. y Chávez, M. Á. 2005. Obtención de Preparados Enzimáticos a Partir de Tallos de Piña (*Ananas Comosus*) con Potencialidades de uso en la Biotecnología y la Medicina. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*. Vol. 36.
- Hornung-Leoni, C. 2011. Avances sobre Usos Etnobotánicos de las *Bromeliaceae* en Latinoamérica. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 10 (No.4): 297 – 314. (a).
- Hornung-Leoni, C. T. 2011. Bromeliads: Traditional plant food in latin America since prehispanic times. *Polibotánica* (32): 219-229. (b).
- Horwitz W. y Latimer G. W. 2005. Official methods of analysis of AOAC international. 18th edition.
- Hossain, M. F., Akhtar, S. y Anwar, M. 2015. Nutritional Value and Medicinal Benefits of Pineapple. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*. 4(1): 84-88.
- Jiménez J. C., Alché J. D., Wang W., y Rodríguez-García M. I. 2007. Alpeorujos y semillas de olivo presentan el mismo tipo de proteínas de almacenamiento. TEC-46 pdf.
- Joy, P. P. 2010. Benefits and uses of pineapple. Pineapple Research Station, Kerala Agricultural University, Kerala, India. [<http://www.kau.edu/prsvkm/Html/BenefitsofPA.htm>].
- Kaufmann, S. y Palzer, S. 2011. Food structure engineering for nutrition, health and wellness. *Procedia Food Science* 1:1479-1486.

- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filtho, J. y Roseane FETT. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Cien. Tecnol. Aliment., Campinas*. 25(4): 726-732.
- Lara, C., Nerio, L. S., y Oviedo L. E. 2007. Evaluación fisicoquímica y bromatológica de la guayaba agria (*Psidium araca*) en dos estados de maduración. *Temas agrarios*. Vol.12: (1), (13-21).
- López-Rubio, A. y Lagaron, J. M. 2012. Whey protein capsules obtained through electrospraying for the encapsulation of bioactives. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 13: 200-206.
- López, L. M., Sequeiros, C., Natalucci, C. L., Brullo, A., Maras, B., Barra, D., y cols. 2000. Purification and Characterization of Macrodontain I, a Cysteine Peptidase from Unripe Fruits of *Pseudananas macrodontes* (Morr.) Harms (*Bromeliaceae*). *Protein Expression and Purification* 18(2): 133-140.

- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., y Desobry, S. 2006. Flavour encapsulation and controlled release - a review. *International Journal of Food Science and Technology* 4(1):1-21.
- Maurer, H. R. 2001. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* Vol. 58.
- Meza-Espinoza, L., Vivar-Vera, M, A., García-Magaña, M, L., Sáyago-Ayerdi S, G., Chacón-López, A., Becerrea-Verdín, E. M., y Montalvo-González, E. 2017. Enzyme activity and partial characterization of proteases obtained from *Bromelia Karatas* fruit and their comparison with *Bromelia penguin* proteases. *Food Sci and Biotech* (In press) doi: 10.1007/s10068-017-0244-6.
- Miranda, M. E., Arellano, J. J., Salazar, B. Z., Hernández, F., Quero, R., y Pérez, L. 2007. Bases para el manejo comunitario de bromelias ornamentales. Editorial: Grupo Autónomo para la Investigación Ambiental A.C. Pag: 18.
- Mondragón, D. M., Ramírez, I. M., Flores, M., y García, J. G. 2011. La familia Bromeliaceae en México (1er ed.). Estado de México, México. Universidad Autónoma de Chapingo.
- Mondragón, R., Julia, J. E., Barba, A., y Jarque, J. C. 2013. El proceso de secado por atomización: formación de gránulos y cinética de secado de gotas. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y vidrio.* Vol. 52. 4: 159-168.
- Mondragón-Chaparro, D. M., Villa-Guzmán, D. M., Escobedo-Sarti, G. J. y Franco-Méndez, A. D. 2006. La riqueza de *bromelias* epífitas a lo largo de una gradiente altitudinal en Santa Catarina Ixtepeji, Oaxaca, México. *Naturaleza y desarrollo.* Vol. 4 núm. 2.
- Montes, C., Felipe, V., Zuñiga, R. A., y Caldón, Y. E. 2014. Descripción morfológica de bromelia karatas recurso genético promisorio para Patía, cauca, Colombia. 12(No.1): 62-70.

- Moreno-Cortez, I.E., Romero-García, J., González-González, V., García-Gutierrez, D., Garza-Navarro, M. A., and Cruz-Silva, R. 2015. Encapsulation and immobilization of papain in electrospun nanofibrous membranes of PVA cross-linked with glutaraldehyde vapor. *Material Science and Engineering C*. 52: 306-314.
- Moreno-Hernández, J. M., Hernández-Mancillas, X. D., Coss, E, L., Mazorra-Manzano, M. A., Rodríguez-Tirado, V. A., y Salazar-Leyva, J. A. 2016. Partial characterization of the proteolytic properties of an enzymatic extract from “aguama” *Bromelia Pinguin* L. fruit grown in Mexico. *Appl Biochem Biotechnol*.
- Moreno-Hernández, J. M., Hernández-Mancillas, X. D., Coss, E, L., Bañuelos-Pérez, M. J., Salazar-Leyva, J. A., Osuna-Ruiz, I., Rodríguez-Tirado, V. A., y Mazorra-Manzano, M. A. 2017. Caracterización parcial de la actividad coagulante y caseinolítica de las proteasas del fruto de “aguama” (*Bromelia pinguin* L.). *Biotecnia. Volumen XIX* (2): 19-24.
- Moyano, D., Osorio, M., Murillo, E., Murillo, W., Solanilla, J., Méndez, J., y Aristizabal, J. (2012). Evaluación de parámetros bromatológicos, fitoquímicos y funcionalidad antioxidante de frutos de bromelia karatas (bromeliaceae). *Vitae* 19(No.1): S439-S441.
- Muthuselvi, L. y Dhathathreyan, A. 2006. Simple coacervates of zein to encapsulate gitoxin. *Colloids and Surfaces* 51(1): 39-43.
- Natalucci, C. L., A. Brullo, L. M- I. López, R.M. Hilal and N. O. Caffini. 1996. Macrodontan, a new protease isolated from fruits of *Pseudananas macrodantes* (Morr.) Harms (Bromeliaceae). *J. Food Biochem*. 19: 443-454.
- Nazzaro, F., Orlando, P., Fratianni, F., y Coppola, R. 2012. Microencapsulation in food science and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. 23: 182-186.
- Nipa, B., Wang, Z., Shi-Ying, X., y Zhang, W. 2008. Therapeutic Application of Pineapple Protease (Bromelain): A Review. *Pakistan Journal of Nutrition* 7(4): 513-520.

- Norregaard, R., Kwon, T., y Frokiaer, J. 2015. Physiology and pathophysiology of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in the kidney. *Kidney Res Clin Pract.* 34: 194-200.
- Oliva-Hernández, Y., Sánchez-Calero, J., Abad-Martínez, M. J., Bermejo-Benito, P., y Marrero-Faz, E. 2012. Evaluación del efecto antiinflamatorio de un extracto orgánico de *Allophylus cominia* (L) Sw. Sobre la actividad de COX2 y FLA-2s. *Boletín latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas.* 12(2): 150-153.
- Onken, J. E., Greer, P. K., Calingaert, B., y Hale, L. P. 2007. Bromelain treatment decreases secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines by colon biopsies in vitro. *Clinical Immunology.* 126: 345–352.
- Parra, R. A. 2011. Revisión: Microencapsulación de Alimentos. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín.* 63(2):5669-5684.
- Payrol, J. A., Obregón, W. D., Trejo S. A., y Caffini, N. O. 2008. Purification and characterization of four new cystein endopeptidases from fruit of *Bromelia pinguin* L. Grown in Cuba. *Protein J* (27):88-96.
- Payrol, J. A., Miranda M., G. Toledo C. y O. Castillo G. (2001) Actividad farmacológica preliminar del fruto de *Bromelia pinguin* L. (piña de ratón). *Revista Cubana de Farmacia* 35:56-60.
- Peña D.A., Aroyo B.A., Gómez P.A., y Tapia I.R. 2004. Bioquímica. Ed. Limusa, 2ª edición, capítulo 3, pp. 96.

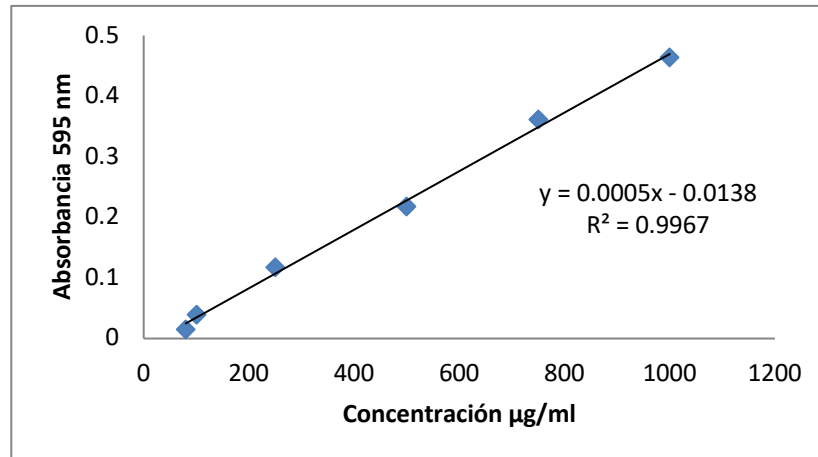
- Pérez-Masiá, R., Lagaron, J. M., y López-Rubio, A. 2014. Morphology and Stability of Edible Lycopene-Containing Microand Nanocapsules Produced Through Electrospraying and Spray Drying. *Food Bioprocess Technol.*
- Pío-León, J. F., López, A. G., Paredes, L. O., Uribe, B., Díaz, C., y Delgado, V. 2009. Physicochemical, Nutritional and Antibacterial Characteristics of the Fruit of *Bromelia pinguin* L. *Plant Foods Hum Nutr* 181-187.
- Rai, M., Asthana, P., Kant, V., Jaiswal, V. y Jaiswal, U. 2009. The encapsulation technology in fruit plants: A review. *Biotechnology Advances* 27(6): 671-679.
- Rajapakse, N., Mendis, E., Jung, W. K., Je, J. Y., and Kim, S. K. (2005). Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Research International*, 38(2), 175-182.
- Ramadwa, T. E., Elgorashi, E. E., McGaw, I. J., Ahmed, A. S., y Eloff, J. N. 2017. Antimicrobial, anti-inflammatory Activity and cytotoxicity of *Funtumia africana* leaf extracts, fractions and the isolated methyl ursolate. *South African Journal of Botany*. 108:126-131.
- Rathnavelu, V., Alitheen, N., Sohila, S., Kanagesan, S., y Ramesh, R. 2016. Potential role of bromelain in clinical and therapeutic applications (Review). *Biomedical Reports*. 5: 283-288.
- Re R., Pellegrini, N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology y Medicine* 26(9): 1231-1237.
- Reyes, M. I., Aguilar, C. N., Prado, L. A., y Martínez J. L. 2011. Residuos agroindustriales para la producción de proteasas fúngicas. *Ciencia Cierta*. No.27.
- Roy, B. 2008. Bromelain: An Overview. *Natural Product Radiante*, Vol. 7(4): 359-363.
- Saito, K., Jin, D. H., Ogawa, T., Muramoto, K., Hatakeyama, E., and Yasuhara, T. (2003). Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(12), 3668-3674 .

- Sánchez-Mendoza, N. A., Cruz-Castellanos, M., Dávila-Ortiz, G., y Jiménez-Martínez, C. (2016). Péptidos con actividad antioxidante provenientes de fuentes animales y vegetales. En M. E. Ramírez Ortiz (Ed.). *Alimentos Funcionales de Hoy*. Barcelona, España: OmniaScience, 117-142.
- Secor Jr, E. R., Carson, W. F., Cloutier, M. M., Guernsey, L. A., Schramm, M., Wu, C. A., y Thrall, R. S. 2005. Bromelain exerts anti-inflammatory effects in an ovalbumin-induced murine model of allergic airway disease. *Cellular Immunology* 237: 68–75.
- Sivarajah, N. 2015. Medicinal Uses of Carica Papaya. *International Journal of Science and Research (IJSR)*, ISSN: 2319-7064
- Sozer, N., y Kokini, J. 2009. Nanotechnology and its applications in the food sector. *Trends in Biotechnology*. Vol.27 No.2.
- Vij, T., y Prashar, Y. 2015. A review on medicinal properties of Carica papaya Linn. *Asian Pac J Trop Dis*; 5(1): 1-6.
- Voet D., Voet J. y Pratt C. 2009. Fundamentos de bioquímica: la vida a nivel molecular. Madrid, España. *Editorial Médica Panamericana*.
- Wang, B., Adhikari, B., y Barrow, C. J. 2014. Optimisation of the microencapsulation of tuna oil in gelatin-sodium hexametaphosphate using complex coacervation. *Food chemistry*. 158: 358-365.
- Zapata, K., Cortes, F. B. y Rojano, B. A. 2013. Polifenoles y actividad antioxidante del fruto de guayaba agria (*Psidium araca*). *Información Tecnológica*. Vol. 24(5): 103-112.

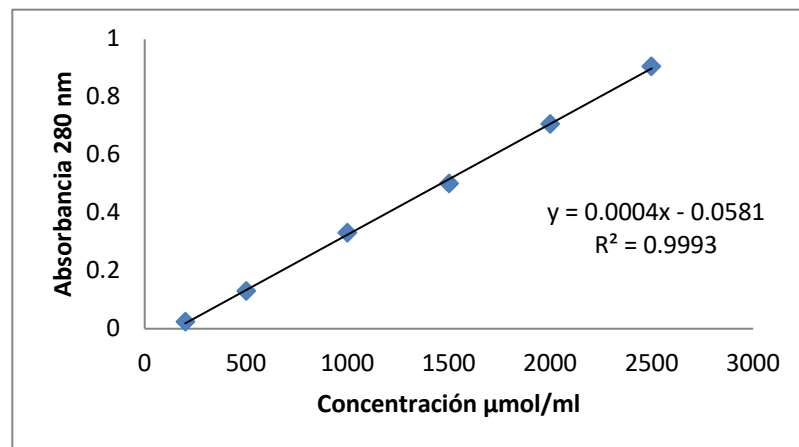
CAPÍTULO 9. ANEXOS

ANEXO A. CURVAS DE CALIBRACIÓN

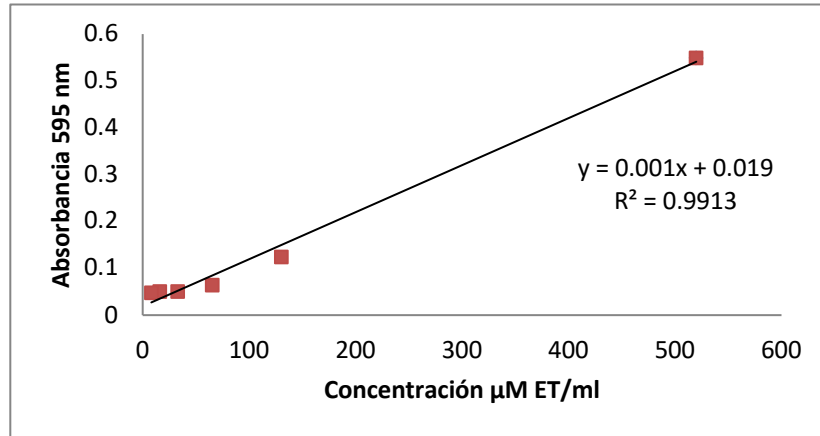
Anexo A1. Curva de calibración Bradford



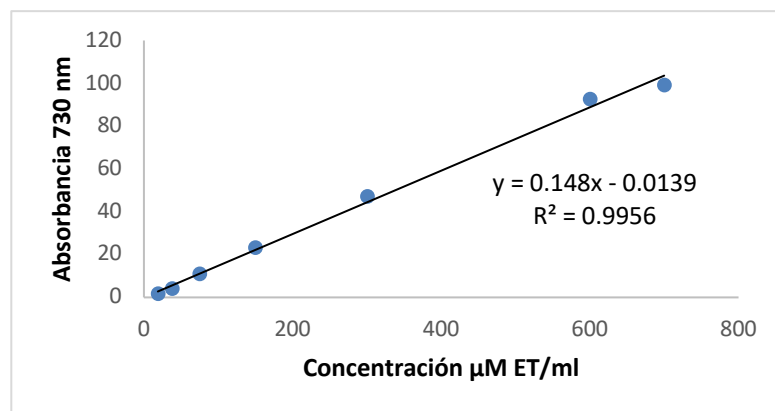
Anexo A2. Curva de calibración L-Tirosina



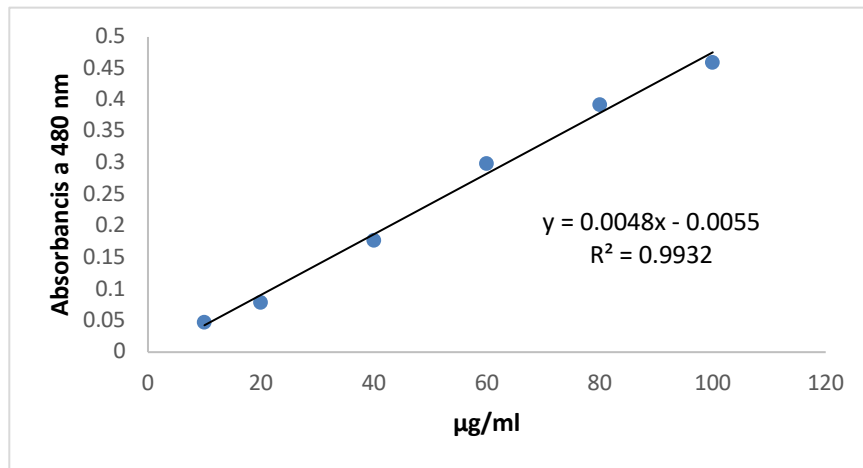
Anexo A3. Curva de calibración FRAP



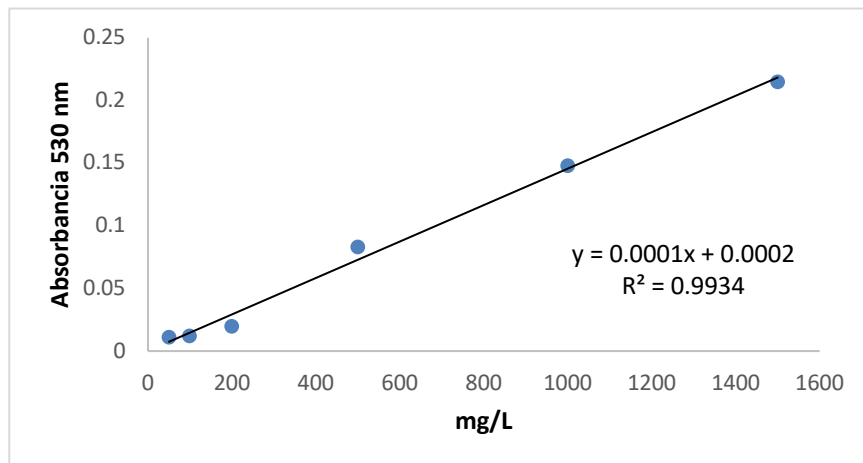
Anexo A4. Curva de calibración ABTS



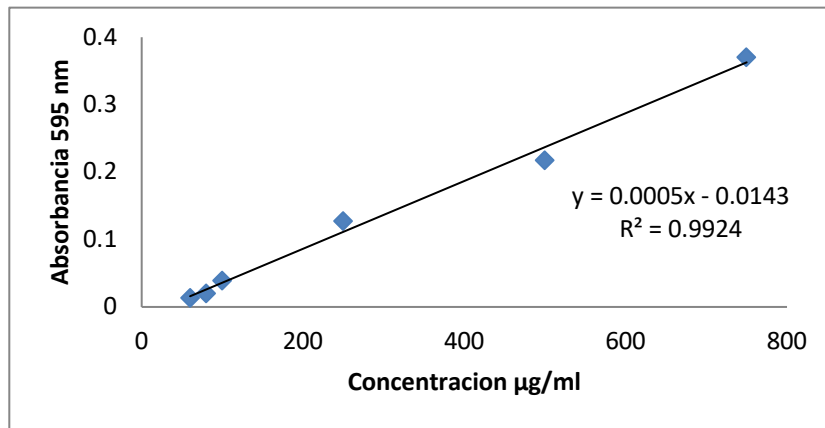
Anexo A5. Curva de calibración de Glucosa (carbohidratos totales)



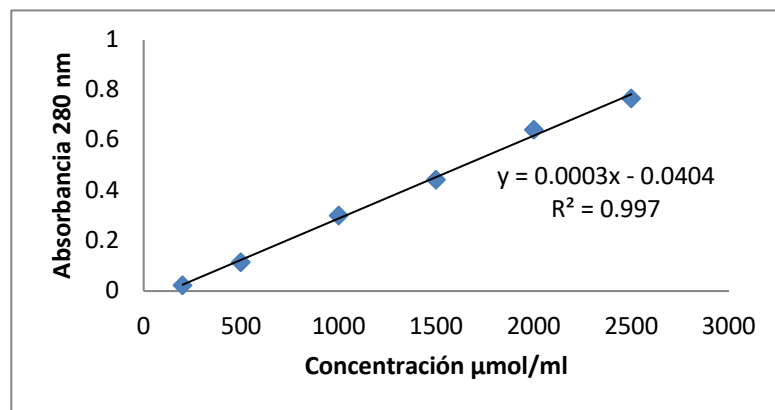
Anexo A6. Curva de calibración de Glucosa (Fibra dietética)



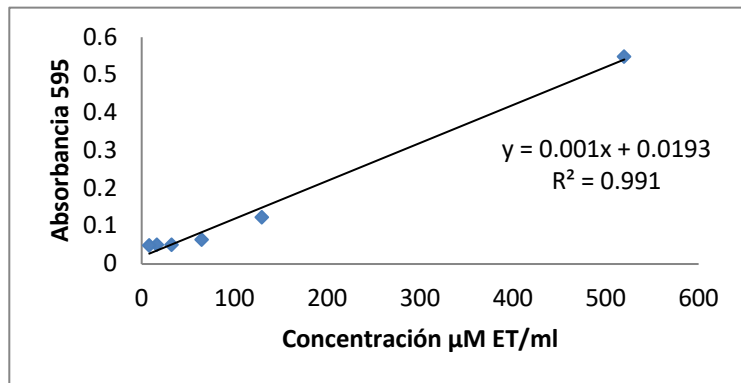
Anexo A7. Curva de calibración Bradford (encapsulados)



Anexo A8. Curva de calibración L-Tirosina (encapsulados)



Anexo A9. Curva de calibración FRAP (encapsulados)



Anexo A10. Curva de calibración ABTS (encapsulados)

