

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

**EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE LA
PAPAÍNA PRESENTE EN LA SEMILLA DE LA LECHOSA
“CARICA PAPAYA L.”**

Presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela
Por las Brs: Guerra V., Dayana C.,
Revetti V., Fanny N.
Para optar al Título
de Ingeniero Químico

Caracas, 2015

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE LA PAPAÍNA PRESENTE EN LA SEMILLA DE LA LECHOSA “CARICA PAPAYA L.”

TUTOR ACADÉMICO: Prof. Francisco Yáñez

COTUTOR ACADÉMICO: Prof. Jaime A. Hernández

Presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela
Por las Brs: Guerra V., Dayana C.,
Reveti V., Fanny N.
Para optar al Título
de Ingeniero Químico



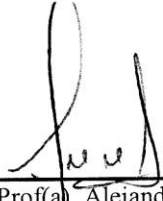

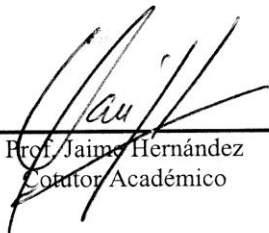
Caracas, 2015

Caracas, Octubre 2015.

Los abajo firmantes, miembros del Jurado designado por el Consejo de Escuela de Ingeniería Química, para evaluar el Trabajo Especial de Grado presentado por las bachilleres Guerra Velarde, Dayana Carolina y Revetti Velarde, Fanny Nohely, titulado:

**EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE LA
PAPAÍNA PRESENTE EN LA SEMILLA DE LA LECHOSA
“CARICA PAPAYA L.”**

Consideran que el mismo cumple con los requisitos exigidos por el plan de estudio conducente al título de Ingeniero Químico, y sin que esto signifique que se hacen solidarios con las ideas expuestas por el autor, lo declaran **APROBADO**

 _____ Prof(a). María Rodríguez Jurado		 _____ Prof(a). Alejandra Meza Jurado
 _____ Prof. Francisco Yáñez Tutor Académico		 _____ Prof. Jaime Hernández Cofesor Académico

*Este trabajo está dedicado a nuestra
ABÚ, ya que quizás has desaparecido de
nuestra vida, pero nunca de nuestro
corazón. A Laura Febres por enseñarnos a
creer cuando no existían motivos para
querer hacerlo.*

AGRADECIMIENTOS

A la ilustre Universidad Central de Venezuela por brindarnos el privilegio de formarnos como Ingenieros Químico en sus aulas.

A nuestros Tutores, el Prof. Francisco Yánez y el Prof. Jaime Hernández por brindarnos la oportunidad de desarrollar este trabajo, por toda su paciencia en la elaboración del mismo, por sus consejos, recomendaciones y por nunca rendirse en nuestro continua corredera, muchas gracias.

A la Prof. María Rodríguez y el Prof. Miguel Ríos, por siempre apoyarnos cuando nos faltaban reactivos, solventes, equipos o cualquier otro material utilizado, gracias.

A la Prof. Oglioly Domínguez, porque acudimos a usted sin conocerla y sin dudarle nos brindo todos sus conocimientos y ayuda para desarrollar con éxito este trabajo, gracias profe.

Nohely Revetti

Agradezco a mis padres, Fany y Luis por darme el apoyo incondicional para el cumplimiento de esta meta. Agradezco a mis hermanas, Yali, Nathalie y Anabely, y a mi Tía Betty, Tío Luis y Luisana, por su presencia, motivación y cariño incondicional.

Doy gracias a mis compañeros y amigos de escuela, Thais, morocho, Nani, Diego S., Gabriel C., Luis, Bárbara, Amanda, René, Gab Pestana, y a todos aquellos que durante este largo tiempo en este pasillo de escuela pasaron a ser más que compañeros, pasaron a ser familia.

A mis mejores amigos, Vane, Nina, Fiore, Nia, Andre, Rossy, Carlitos y Wolfgang, Pedro, Oswaldo, Cherrez, Anthony, Jesús, Boli, Cesar, Carlos David, quienes no sólo me acompañaron en el aprendizaje académico, sino también en el crecimiento personal y apoyo incondicional para cumplir todas mis metas planteadas.

A mi compañera de tesis, prima y amiga Dayana, con quien he compartido muchas alegrías a lo largo de nuestras vidas, y ahora una de las más importantes, ser Ingenieras Químicas.

Gracias a Todos! Nohely

Dayana Guerra

Agradezco a mi mami y papi, Betty y Luis, que siempre han estado ahí para darme todo lo que necesito, pero lo más importante por darme apoyo a lo largo de mi vida. A mi hermana Luisana y hermano Luis Fernando, por ser mis compañeros desde siempre los Amo. A mis primas Yali, Nathalie y Anabely por su presencia y cariño incondicional.

A mi mejor amiga Daniela Gotera, ya que no hay distancia que separe a dos amigas que se aman, gracias por ser mi apoyo por siempre. A Freddy Jesús porque ha estado conmigo desde el colegio, gracias por ser esa voz que me recordaba que si se podía. A los amigos que me regalo la universidad, mis dos amigas incondicionales Rosa y Giselle nada nos podrá separar, gracias por estar en todo, las quiero.

A mi amiga Laura Febres que cambio mi forma de ver las cosas, que me enseñó tanto, porque fue una persona mágica en mi vida. Gracias me enseñaste a creer en la vida, entonces Patricia solo me queda decirte “ It’s been a long day without you, my friend and I’ll tell you all about it when I see you again”.

A Charles, mi compañero de proyectos, a Amanda mi amiga viajera y a Barbie mi amiga la doctora; definitivamente la vida nos unió en uno de los momentos más tristes, pero gracias a eso somos más que amigos, los adoro gracias por todas las risas.

A mis compañeros y amigos de escuela, Jennifer, Eduardo, Morocho, Mayra, Diego, Zoreny, Walter, Dubraska, Principe Rojo, Andres (Chequelo), Yofra, Robert, Gusa, Thais, Nany, Gabriel y a todos aquellos que durante toda la carrera y tiempo en este pasillo de escuela pasaron a ser más que compañeros.

A mi prima y compañera de tesis, la vida nos hizo primas pero el corazón nos convirtió en hermanas, gracias por todo Te Adoro.

Gracias a Todos! Dayi.

Guerra V., Dayana C.

Revetti V., Fanny N.

**EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE LA
PAPAÍNA PRESENTE EN LA SEMILLA DE LA LECHOSA
("CARICA PAPAYA L.")**

Tutores Académicos: Prof. Jaime Hernández, Prof. Francisco Yáñez

**Tesis. Caracas, UCV. Facultad de Ingeniería. Escuela de Ingeniería Química. 2015,
81 p.**

Palabras Claves: Extracción, Enzima, Papaína, Lechosa, Extracción Asistida por Ultrasonido, Extracción Asistida por Microondas, Extracción Soxhlet.

Resumen: La papaína, es una enzima proteolítica que tiene la capacidad de digerir las proteínas de los alimentos. Se obtiene usualmente del látex de la "*Carica Papaya L.*", sin embargo, no sólo éste contiene esta importante enzima. De hecho, todas las partes de la planta de lechosa pueden usarse para la extracción de papaína, la semilla de la lechosa es una fuente potencial de esta enzima; la cual, no es aprovechada convirtiéndose en un desecho comercial. La gama de usos de esta enzima es muy amplia, en la industria alimenticia es utilizada como ablandador de carnes, también es usada en las cervecerías como clarificador. Por otro lado, es empleada en la industria medicinal para el control de insuficiencias gástricas y en el tratamiento de enfermedades digestivas, entre otros. Debido a la necesidad de estas industrias de obtener papaína, es preciso realizar un estudio de las técnicas de extracción aplicables para la obtención de esta enzima, con el fin de determinar cuál de éstas proporciona mayor rendimiento y contribuir con su utilidad comercial. Es por ello que este trabajo tuvo como objetivo evaluar los métodos de extracción de la papaína contenida en la semilla de la lechosa, mediante los métodos de Extracción Soxhlet, Extracción Asistida por Microondas (EAM), Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU), la posterior caracterización de los extractos obtenidos y la elección del mejor método de extracción basado en los rendimientos. Mediante la extracción Soxhlet se determinaron las condiciones de humedad (semilla seca, húmeda o parcialmente húmeda), y el mejor solvente a utilizar (etanol, agua destilada, acetato de etilo y n-hexano), obteniendo como mejores parámetros, semilla parcialmente húmeda y mejor solvente etanol comercial con un rendimiento (R) = 53(% p/p) en base seca. Para EAM se realizó un barrido de potencia entre (20-100) %, obteniendo como mejor potencia 60 %, y un tiempo máximo de 22 s con R = 51 (% p/p). En EAU se trabajó con temperaturas de (30, 45, 60)°C con tiempos de (10, 20, 45) min, donde se obtuvo un rendimiento de 41(%p/p) para un tiempo de 45 min a una temperatura de 30°C. Empleando el Método de Coagulación de la Leche (Balls and Hoover), se verificó la existencia de actividad enzimática en los extractos obtenidos. En la Espectroscopia de Infrarrojo, se confirmó la presencia de papaína, mediante la identificación de los grupos funcionales de esta enzima. Finalmente al comparar los resultados de todas las técnicas de extracción mediante sus rendimientos y tiempos de extracción, el método más eficiente para la obtención de papaína contenida en la semilla de la lechosa es la Extracción Asistida por Microondas (EAM).

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	3
FUNDAMENTOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	3
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
1.2. ANTECEDENTES.....	5
1.3. OBJETIVOS.....	10
1.3.1 Objetivo General.....	10
1.3.2 Objetivos Específicos	10
CAPÍTULO II	11
MARCO TEÓRICO.....	11
2.1. LECHOSA (<i>Carica Papaya L.</i>)	11
2.2. PAPAÍNA.....	13
2.2.1. Aplicaciones Industriales.....	15
2.2.2. Mercadeo de la Papaína	17
2.3. MÉTODOS DE SEPARACIÓN	17
2.3.1. Filtración.....	18
2.3.2. Evaporación.....	18
2.3.3. Destilación.....	18
2.3.4. Extracción.....	19
2.3.5. Técnicas de Extracción	21
2.3.6. Extracción Continua	21
2.3.7. Extracción tipo Soxhlet.....	21
2.3.8. Extracción Asistida por Microondas (EAM)	23

2.3.9. Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU).....	29
2.4. DISOLVENTES Y SOLUBILIDAD	33
2.5. CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS QUÍMICO.....	34
2.5.1. Espectroscopia de Infrarrojo (IR)	35
CAPITULO III.....	37
METODOLOGÍA	37
3.1. INVESTIGACIÓN PREVIA.....	38
3.2. PREPARACIÓN DE LA MATERIA PRIMA.....	38
3.3. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD QUE CONTIENEN LAS SEMILLAS DE LECHOSA	38
3.4. EXTRACCIÓN DE LA PAPAÍNA	39
3.4.1. Extracción convencional tipo Soxhlet	39
3.4.2. Extracción Asistida por Microondas (EAM).....	43
3.4.3. Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU).....	45
3.5. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	46
3.5.1. Método de coagulación de la leche (Balls and Hoover)	46
3.6. RECUPERACIÓN DEL SOLVENTE POR MEDIO DE DESTILACIÓN AL VACÍO	47
3.7. CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	48
CAPÍTULO IV	50
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	50
4.1. EVALUACIÓN PRELIMINAR	50
4.2. EXTRACCIÓN CON SOXHLET.....	50
4.2.1. Influencia de la humedad de la materia vegetal en el rendimiento.....	50

4.2.2. Caracterización fisicoquímica de los extractos obtenidos durante la extracción de papaína.....	53
4.2.3. Rendimiento por solvente	56
4.2.4. Caracterización por Espectroscopia de Infrarrojo (IR) de los extractos obtenidos según el solvente empleado.....	58
4.3. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS (EAM).....	60
4.3.1. Determinación del tiempo máximo de extracción	60
4.3.2. Influencia de la potencia en el rendimiento por EAM.....	61
4.4. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO (EAU).....	62
4.4.1. Influencia de la temperatura en la extracción de papaína por EAU	62
4.4.2. Influencia del tiempo de extracción en los rendimientos por EAU.....	63
4.5. COMPARACIÓN DE RENDIMIENTOS DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	65
4.6 CARACTERIZACIÓN POR ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO (IR) DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS SEGÚN EL MÉTODO DE EXTRACCIÓN EMPLEADO.....	66
4.7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	69
LOGROS DE LA INVESTIGACIÓN	71
CONCLUSIONES	73
RECOMENDACIONES.....	75
REFERENCIAS	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1. Fruto de Lechosa. (Fundación del Desarrollo Agropecuario, 1998).....	11
Figura N° 2. Estructura cristalográfica de la papaína. (Fosado, 2011)	14
Figura N° 3. Estructura de la papaína. (Perry & Hegeman, 2007)	15
Figura N° 4. Extracción líquido-líquido por contacto continuo, con recuperación de disolvente. (Elaboración propia).....	20
Figura N° 5. Extractor sólido-líquido. (Lamarque & col., 2008)	22
Figura N° 6. Espectro electromagnético. (Carballido, 2008).....	24
Figura N° 7. Onda electromagnética. (Carballido, 2008)	25
Figura N° 8. Modelo de equipo de Extracción Asistida por Microondas. (ElKhorri, Pare, Bélanger, & Pérez, 2007).....	26
Figura N° 9. Generación de burbujas en el líquido. (Arias & López, 2013)	32
Figura N° 10. Esquema general de metodología (Elaboración propia).....	37
Figura N° 11. Equipo microondas marca Sharp modelo R-520L (Fuente Propia).....	43
Figura N° 12. Equipo de Ultrasonido marca Elmasonic modelo D-78224.....	45
Figura N° 13. Montaje utilizado para la recuperación del solvente. (Fuente propia)	48
Figura N° 14. Montaje utilizado para la recuperación del solvente. (Fuente propia)	48
Figura N° 15. Equipo de Espectroscopia de Infrarrojo de doble haz.....	49
Figura N° 16. Semillas Húmedas, Parcialmente Húmedas y Semillas Deshidratadas.....	51
Figura N° 17. Contenido de Humedad presente en la semilla de la Lechosa.	52
Figura N° 18. Conjunto de Muestras Resultantes de la Extracción con el Equipo Tipo Soxhlet con diferentes solventes. (Elaboración propia)	55
Figura N° 19. Conjunto de Semillas Resultantes de la Extracción con el Equipo Tipo Soxhlet con diferentes solventes. (Elaboración propia).....	56

Figura N° 20. Espectros infrarrojos de los extractos obtenidos utilizando etanol, n-hexano y acetato de etilo como solvente de extracción aplicando el equipo Soxhlet comparados con el espectro infrarrojo de la papaína comercial	58
Figura N° 21. Influencia de la potencia en el rendimiento de la extracción de papaína.	61
Figura N° 22. Influencia de la temperatura en el rendimiento de EAU.	62
Figura N° 23. Influencia del tiempo en el rendimiento de EAU.	64
Figura N° 24. Influencia del tiempo y la temperatura en el rendimiento de EAU.	65
Figura N° 25. Espectros de Infrarrojo de los extractos de la semilla de la Lechosa según el método de extracción empleado.....	67
Figura N° 26. Formación de coágulos en la leche por la acción de papaína comercial.....	70
Figura N° 27. Formación de coágulos de leche por la acción de la papaína extraída de la semilla de lechosa, según el solvente empleado.....	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1. Contenido de Nutrientes en 100g de pulpa fresca de Lechosa. (Guerra & Quijano, 2012).....	12
Tabla N° 2. Constantes dieléctricas y factor de disipación de solventes más usados para extracciones.....	28
Tabla N° 3. Ventajas y desventajas de la Extracción por EAU. (Arias & López, 2013)	32
Tabla N° 4. Grupos funcionales de interés presentes en la estructura de la papaína y sus señales características	36
Tabla N° 5. Rendimiento según la humedad contenida en la semilla.....	52
Tabla N° 6. Composición Aproximada de las semillas de la Lechosa. (Marfo, Oke, & Afolabi, 1986)	53
Tabla N° 7. Caracterización Fisicoquímica de los Solventes Utilizados. (Elaboración propia)	54
Tabla N° 8. Valores de Rendimiento de los Solventes Utilizados en el Equipo Tipo Soxhlet.....	57
Tabla N° 9. Barrido de tiempos, a potencia 100%, para la determinación del tiempo máximo de exposición.....	60
Tabla N° 10. Rendimientos promedio para los métodos de extracción de la papaína presente en la semilla de la lechosa.....	65
Tabla N° 11. Método de Coagulación de la Leche según el solvente empleado.	69

INTRODUCCIÓN

La *Carica Papaya L.*, comúnmente llamada lechosa es una fruta cultivada en países tropicales de alto consumo a nivel mundial. Es una baya de tamaño y forma variable, con una pulpa dulce de color amarilla o rojo-naranja. La lechosa contiene un líquido lechoso y blanco llamado látex, que va desapareciendo a medida que la fruta madura. Éste líquido se emplea usualmente, para la obtención de papaína. Sin embargo, no sólo el látex de la lechosa contiene papaína, de hecho todas las partes de la fruta contienen papaína, y una fuente potencial de ésta son las semillas cuya a de ventaja es el aprovechamiento de un desecho a nivel comercial.

La papaína es una enzima proteolítica que tiene la capacidad de digerir las proteínas de los alimentos y posee una amplia gama de usos, especialmente en la industria alimenticia, donde es empleada como aclarador de cervezas y ablandadora de carnes. En la industria farmacéutica para la elaboración de medicinas antiinflamatorias, el control de insuficiencias gástricas y en el tratamiento de acidez estomacal, debido a que el consumo de lechosa contribuye a neutralizar el exceso de acidez en el estómago, también es empleada en el tratamiento de enfermedades hepáticas.

Debido a la necesidad de estas industrias de obtener papaína es preciso realizar un estudio de las técnicas de extracción aplicables para la obtención de esta enzima. Por tal motivo, en el presente Trabajo Especial de Grado se realizó el estudio de la extracción de papaína contenida en la semilla de la lechosa empleando el método convencional tipo Soxhlet, y no convencionales los cuales son la Extracción Asistida por Microondas (EAM) y Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU). Es por esto que, se evaluaron los métodos de extracción de papaína contenida en la semilla de la lechosa (*Carica Papaya L.*), tomando en cuenta el rendimiento obtenido de la extracción y tiempos de extracción rentables. Dentro de cada una de las técnicas de extracción, se evaluaron las condiciones de operación óptimas para la extracción

de papaína como lo son, humedad de la materia prima, temperatura, tiempo, relación soluto/solvente y potencia.

Del mismo modo, se determinó el solvente más eficiente, basándose en el rendimiento obtenido, el costo y su capacidad de extraer papaína, ya que los extractos obtenidos fueron sometidos a pruebas enzimáticas para verificar la presencia de papaína, usando el método de Balls and Hoover y caracterizados por el método de Espectroscopía de Infrarrojo (IR), con el fin de verificar la presencia de los grupos funcionales de la estructura de la papaína en los extractos obtenidos.

CAPÍTULO I

FUNDAMENTOS DE LA INVESTIGACIÓN

A continuación se presenta el planteamiento del problema objeto de estudio, así como los objetivos generales y específicos de la investigación. En esta sección también se muestran los antecedentes que servirán de apoyo en este Trabajo Especial de Grado.

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La papaína, es una enzima proteolítica que tiene la capacidad de digerir las proteínas de los alimentos. Se obtiene usualmente del látex de la *Carica Papaya*. Las incisiones se hacen en la fruta verde para recolectar el látex de la misma. Sin embargo, no sólo éste contiene esta importante enzima. De hecho, todas las partes de la planta de lechosa pueden usarse para la extracción de papaína, excepto la raíz. Una fuente potencial es la semilla de la lechosa, cuya ventaja es el aprovechamiento de la fruta madura, ya que ésta no contiene suficiente papaína, excepto en sus semillas. (Gutiérrez & Velásquez, 2009)

La gama de usos de esta enzima es muy amplia, como por ejemplo en la industria alimenticia es utilizada como ablandador de carnes, mediante la inyección al animal antes de su sacrificio o en la cocción. También es usada en las cervecerías como clarificador.

Por otro lado, es empleada en la industria medicinal para el control de insuficiencias gástricas y en el tratamiento de enfermedades digestivas tales como, gastritis o acidez estomacal debido a que el consumo de lechosa contribuye a neutralizar el exceso de acidez en el estómago. Además, es usada en el tratamiento de tejidos putrefactos, en heridas gangrenosas y en estudios para la determinación de cáncer estomacal. Como medicamento natural, la papaína es usada como antiinflamatorio en lesiones traumáticas. De igual forma, esta enzima es empleada por

laboratorios oftalmológicos en la fabricación de productos de limpieza de lentes de contacto. Asimismo, la papaína se emplea en la industria textil para suavizar la lana y la seda; en la industria del caucho para el tratamiento del látex y en la industria del cuero.

Debido a la necesidad de estas industrias de obtener papaína, ya que se trata de un producto cuyas propiedades no han podido ser reproducidas en una enzima sintética, lo que la vuelve insustituible en muchas de sus aplicaciones, es preciso realizar un estudio de las técnicas de extracción aplicables para la obtención de esta enzima, entendiéndose éstas como las separaciones de un componente de una mezcla por medio de un disolvente selectivo, con el fin de determinar cuál de estas técnicas proporciona mayor rendimiento del compuesto de interés y contribuir con su utilidad comercial. (Costa & Col., 1991).

En la actualidad, no se han realizado estudios de la extracción de papaína presente en la semilla de la lechosa empleando métodos convencionales como, la Extracción tipo Soxhlet, y no convencionales como Extracción Asistida por Microondas (EAM) y Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU). Es por ello que el alcance de la investigación está definido por la extracción de la papaína contenida en las semillas de la lechosa, garantizando el aprovechamiento de un desecho a nivel comercial, mediante el uso de métodos innovadores de extracción de esta enzima presente en la semilla. Los extractos obtenidos serán sometidos a pruebas enzimáticas para verificar la presencia de papaína, usando el método de Balls and Hoover. Del mismo modo, los extractos obtenidos serán caracterizados por el método de Espectroscopía de Infrarrojo (IR).

En base a lo anteriormente expuesto, se propone evaluar los métodos de extracción de la papaína contenida en la semilla de la lechosa "*Carica Papaya L.*" y las variables que influyen en el proceso, para posteriormente determinar las condiciones de operación, el solvente y el método de extracción.

1.2. ANTECEDENTES

Según lo planteado fue necesario realizar una investigación previa de trabajos ya ejecutados estableciendo así, los antecedentes de esta investigación, estos permiten establecer las bases teóricas y metodológicas para la realización del presente trabajo de grado.

Glibota, Garro y Judis, 2000. “*Actividad proteolítica de restos del fruto de *Carica papaya**”. Este trabajo tuvo como objetivo principal establecer parámetros indicativos para el aprovechamiento integral en la industrialización del fruto de *Carica papaya L.* con respecto al uso de los restos no utilizados. Planteando el aprovechamiento integral de los restos del fruto (cáscara y semillas), a través de la extracción de las enzimas presentes en los mismos. Existen referencias al aprovechamiento industrial de bromelina a través de restos de ananás, lo cual se realiza bajo dos procesos industriales alternativos: Compresión de los restos, hasta obtener un jugo conteniendo actividad proteolítica o por extracción con buffer fosfato de potasio a un pH entre 5,5 y 7,5. La estrategia de estos procesos continua con las siguientes operaciones: filtración, precipitación con solvente orgánico o sulfato de amonio y purificación por cromatografía en sephadex. La cantidad de sustancia seca que se extrajo con buffer de los restos de frutos (cáscara y semillas) fue cercana al 2% de la cantidad de restos para la extracción (10 mg de sustancia seca / gr. de restos frescos). La cantidad de proteína que se midió a 280 nm. fue de 5mg de proteína/ gr. de restos. Se concluyó que, la utilización de restos de frutos no aprovechados en la industrialización de dulces, podrían emplearse para la obtención de enzimas proteolíticas. La actividad específica enzimática obtenida en este proceso antes de las operaciones de precipitación y secado es relativamente alta, por lo cual sería interesante estudiar estas operaciones y las condiciones para mantener esta actividad con el menor porcentaje de pérdida posible.

Aguirre y Castillo, 2009. “*Extracción y estudio comparativo de las enzimas proteolíticas del fruto Toronche (*Carica-stipulata*) y de la papaya (*Carica-papaya*) y su aplicación en la industria alimenticia*”. En este trabajo se realizó la extracción y

el estudio comparativo de las Enzimas Proteolíticas del fruto Toronche y de la Papaya y su aplicación en la industria alimenticia. El látex fue extraído mediante incisiones verticales tanto en la fruta verde del toronche como de la papaya, las cuales fueron sometidas al proceso de extracción del látex y al proceso de secado del látex mediante el método de secado por estufa, al igual que se realizaron experimentaciones para determinar la actividad enzimática de la papaína presente en el látex de ambos frutos mediante el método de coagulación de leche (Balls and Hoover) y el método de determinación de proteínas en leche. Por otro lado se realizó la aplicación de la enzima papaína en la industria cervecera demostrando que por cada 11 gramos de enzima papaína obtenida del fruto toronche se obtiene la turbidez necesaria por hectolitro de cerveza comercial.

El estudio realizado por Aguirre y Castillo aporta a este trabajo de investigación la metodología que se llevará a cabo para la determinación de la actividad enzimática de la papaína obtenida de la semilla de la lechosa.

Gutiérrez, Velásquez y Ferrer, 2009. “*Determinación del efecto de la maduración de la lechosa (Carica Papaya L) sobre la concentración de la Papaína*”. Este trabajo fue de Tipo Correlacional con Diseño Experimental, basado en la Observación Directa y Documental. Se estudió el efecto de la maduración de la lechosa sobre la concentración de papaína, extrayendo ésta directamente de la pulpa de la lechosa (*Cariaca Papaya L*) de la variedad Red Lady, a partir de cada uno de sus seis estados de maduración, definidos por la consistencia del fruto y el color de la cáscara del mismo; se realizaron pruebas fisicoquímicas a las muestras, midiendo pH, sólidos solubles, contenido de cenizas y humedad. Se purificó la papaína por precipitación de la sal en dos pasos, se refinó por diálisis donde se utilizó una membrana que permitió que las impurezas de las muestras fluyan hasta el exterior a través de sus micro poros; y por último se cuantificó por el método N° 971.16 de la A.O.A.C (Association of Official Analytical Chemists), concluyendo así que a medida que la maduración del fruto transcurre hay menos concentración de papaína en la pulpa.

Gracias a la investigación realizada por Gutiérrez, Velásquez y Ferrer se confirma la presencia de papaína en las semillas de la lechosa, siendo el estado de maduración de la fruta una variable que no afecta la presencia de la enzima en los restos de la fruta que son la materia prima para esta investigación.

Binti, 2010. “*The Extraction of Papain from papaya leaves*”. El uso de hojas de lechosa para extraer la enzima papaína se evaluó empleando diferentes técnicas de extracción, principalmente utilizando el método de molienda, extracción asistida con enzimas y extracción con ultrasonido. A continuación, la concentración de enzima fue determinada midiendo la cantidad de aminoácido liberado en la reacción del ensayo y a su vez, de la proteasa. La combinación del método de molienda y extracción asistida con enzima fue probada para dar mayor rendimiento de la papaína, la cual fue un 36,75% por encima del uso de la molienda sola. A continuación, se purificó aún más la papaína extraída mediante el uso de sulfato de amonio por precipitación. La concentración optimizada de saturación de sulfato de amonio era una concentración del 55% de m/v, para así precipitar completamente la proteína. La combinación de molienda y extracción asistida con enzima con ultrasonido puede considerarse como una técnica potencial de extracción para obtener la papaína, ya que es más delicada hacia la extracción de proteínas. Además, se recomienda realizar la investigación usando otra fuente de obtención de papaína, por ejemplo, de los pecíolos y tallos.

Gil, Bedoya, Millan y Benavides (2012) “*Papaína extraída a partir de la cáscara de la papayuela perteneciente a la especie (Carica papaya L.), por medio de microondas con aplicación en el ablandamiento de la carne bovina.*” La papaína es una enzima comúnmente empleada en el ablandamiento de carnes, pero su obtención a escala industrial se basa en la extracción por medio de incisiones longitudinales a la papayuela, técnicamente llamadas “lechado con bastidor”, y posteriormente es secada por medio de horno convencional, aspersion o liofilización. Estos procesos toman tiempo y presentan pérdidas del extracto durante la transformación hasta obtener el producto final debido a la extensa manipulación, lo cual puede afectar su actividad enzimática. Esta investigación tuvo como objetivo evaluar la extracción de papaína usando el microondas, como apertura a un área de conocimiento no estudiada y

alternativa para el aprovechamiento de residuos de la agroindustria. Consistió en varias etapas: la primera fue la caracterización fisicoquímica del fruto para estandarizar la materia prima, seguida por la extracción a partir de las cáscaras de papayuela (*Carica Papaya L.*) en presencia de etanol analítico. Se establecieron las condiciones del microondas con una potencia de 390 W a un tiempo de 30 segundos. Posteriormente, el extracto se filtró y se concentró para ser aplicado sobre trozos de carne bovina corte posta durante 60 segundos. El efecto del extracto sobre el ablandamiento de la carne se verificó mediante el análisis de perfil de textura, durante los tiempos de: 0 (textura inicial), 5 y 10 minutos. El análisis estadístico reportó diferencias significativas respecto a la dureza de los trozos de carne a los 5 minutos de almacenamiento, comparado con los demás tiempos, y alcanzó un ablandamiento de 50%. Aportándole a nuestra investigación que la extracción de la papaína por microondas es una alternativa para la obtención de esta enzima en tiempos más cortos evitando la degradación de la misma, en comparación con los métodos tradicionales.

Arias y López, 2013. “*Comparación de los métodos de extracción de la pectina contenido en el albedo de la Naranja (Citrus Sinensis L.)*” Este trabajo tuvo como objetivo evaluar las condiciones de operación que influyen en la extracción de la pectina del albedo de naranja, mediante los métodos de Extracción Soxhlet, Hidrodestilación (HD), Hidroextracción, Extracción Asistida por Microondas (EAM), Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU) e Hidrólisis Ácida (HA), la posterior caracterización de los extractos obtenidos y la elección del mejor método de extracción basado en los rendimientos. Se seleccionaron las naranjas de jugo o criollas adquiridas en Caracas. Mediante la extracción Soxhlet se determinaron las condiciones de humedad (albedo seco o húmedo), tamaño (0,5;1;1,5) cm², relación materia vegetal/solvente entre (1:3-1:6), madurez, almacenamiento de los albedos (frescos o refrigerados) y el mejor solvente a usar (metanol, etanol, I-propanol, agua destilada, acetona, acetato de etilo y hexano), obteniendo como mejores parámetros, albedo húmedo y fresco de 0,5 cm², mejor solvente etanol comercial (96 %) y relación materia vegetal/solvente 1:5 (%*p/v*) con un rendimiento de 31,70% (*p/p*) en base seca. Para EAM se realizó un barrido de potencia entre (10-100) % y se varió la relación materia vegetal/solvente entre (1:2-1:5), obteniendo

como mejor potencia 60%, un tiempo de 30 segundos y relación materia vegetal/solvente 1:4 con un rendimiento de 17,91% p/p. En EAU se trabajó con temperaturas de (30, 45, 60) °C con tiempos de (20, 40, 60) min y una relación Soluta/Solvente de 1:4, donde se obtuvo un rendimiento de 22,07% (p/p) para un tiempo de 40 minutos a una temperatura de 60°C. En HA se trabajó con una temperatura de 60°C, tiempo de 30 minutos y se varió el pH (1.5;2;3) obteniéndose pH de 2 como el mejor con un rendimiento de 28,25% En Hidroextracción se obtuvo un rendimiento de 35,06 % p/p y en HD se obtuvo un rendimiento de 19,05% p/p. En la Espectroscopia de Infrarrojo, se confirmó la presencia de pectinas en los extractos obtenidos, mediante la identificación de los grupos funcionales de las pectinas. Finalmente, al comparar los resultados de todas las técnicas de extracción mediante sus rendimientos y tiempos de extracción, el mejor método a nivel industrial es la HA y a escala de laboratorio es la EAU.

El trabajo de investigación realizado por Arias y López aplica la extracción tipo Soxhlet, extracción asistida por microondas y la extracción asistida por ultrasonido, las cuales son empleadas en este estudio para la extracción de papaína, tomando como referencia la metodología experimental empleada para la extracción de la pectina contenido en el albedo de la naranja, en la extracción de la papaína contenida en la semilla de la lechosa.

Febres y Guerra (2013) “Evaluación de la relación semilla/solvente para la extracción de la papaína contenida en la semilla de la lechosa “*Carica Papaya L.*” Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la relación de semilla/solvente que influyen en la extracción de papaína presente en la semilla de la lechosa “*Carica Papaya L.*” utilizando el método convencional de extracción tipo Soxhlet. La extracción se realizó con semillas húmedas por el método Soxhlet por 24 horas utilizando como solvente agua destilada y probando la relación materia vegetal de 1:5, 1:10 y 1:15. De la investigación se obtuvo que con la relación 1:5 no se podía realizar la extracción ya que el mismo se agotaba interrumpiendo el proceso, mientras que con la relación 1:10 el rendimiento obtenido fue de 9,42% p/p, y con una relación 1:15 un rendimiento de 12,48% p/p siendo la mejor relación de semilla/solvente 1:15. Se seleccionó este

trabajo de investigación como antecedente ya que le aportó a esta investigación la relación a utilizar en la extracción de la papaína contenida en la semilla de la lechosa.

1.3. OBJETIVOS

En base a la información presentada, en este trabajo de investigación se planteó el siguiente objetivo general y los objetivos específicos

1.3.1 Objetivo General

Evaluar los métodos de extracción de la papaína contenida en la semilla de la lechosa “*Carica Papaya L.*”

1.3.2 Objetivos Específicos

1. Determinar el solvente más eficiente, empleando el método de Extracción Convencional tipo Soxhlet, mediante el rendimiento del extracto obtenido
2. Determinar el tiempo máximo de residencia y la mejor potencia de extracción a utilizar, empleando el equipo de Extracción Asistida por Microondas (EAM), a partir del rendimiento del extracto obtenido.
3. Determinar el tiempo de residencia y la mejor temperatura de extracción a utilizar, empleando el equipo de Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU), considerando el rendimiento del extracto obtenido.
4. Comparar los rendimientos de los métodos aplicados en la extracción de la papaína presente en la semilla de la lechosa “*Carica Papaya L.*”.
5. Determinar la presencia de papaína mediante la caracterización de los extractos obtenidos por la técnica de Espectroscopia de Infrarrojo (IR).
6. Analizar la actividad enzimática de la papaína obtenida de la semilla de la lechosa “*Carica Papaya L.*”, con el método de Balls and Hoover.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

En este capítulo se describen los aspectos teóricos asociados a este Trabajo Especial de Grado, específicamente de la fruta lechosa y los compuestos que contiene, así como sus especificaciones químicas. Posteriormente, se desarrollan los conceptos relacionados con las diferentes técnicas de extracción y los solventes empleados, y por último las técnicas analíticas de caracterización de los extractos.

2.1. LECHOSA (*Carica Papaya L.*)

La papaya, comúnmente llamada lechosa, es una de las frutas tropicales más conocidas y consumidas a nivel mundial, la planta se cultiva extensamente en los países del trópico y subtropical. La lechosa es una baya de tamaño, peso y forma variable, ya que depende de la variedad o selección. Mide de 10 a 60 cm de largo, siendo el color de la pulpa también variable con la selección, normalmente es amarilla o rojo-anaranjada, de textura suave y de un espesor de 3 a 5 cm. En la superficie del fruto se puede encontrar surcos poco profundos, la piel del fruto es suave y contiene un líquido lechoso y blanco llamado látex, que al ir madurando el fruto éste va desapareciendo, la cáscara se torna de verde oscuro a verde claro y luego a amarillo-dorado. Las semillas se encuentran dentro de la cavidad interna del fruto, éstas son esféricas, pequeñas y negras y están envueltas en una capa mucilaginosa llamada sarcotesta o cubierta (Fundación del Desarrollo Agropecuario, 1998).

A continuación en la Figura N° 1 se observa la lechosa con un corte transversal para poder visualizar el interior de la misma.



Figura N° 1. Fruto de Lechosa. (Fundación del Desarrollo Agropecuario, 1998)

Además de tener un agradable sabor es bastante saludable, con un valor nutritivo alto, aportando con solo 100 gramos los requerimientos mínimos diarios de vitamina C y la mitad de vitamina A, ésta a su vez posee complejos de vitamina B (B1, B2, B12), igualmente es una fuente importante de fósforo y calcio (Ferrer, Gutiérrez, & Velásquez, 2009), como se puede observar en la Tabla N°1.

Tabla N° 1. Contenido de Nutrientes en 100g de pulpa fresca de Lechosa. (Guerra & Quijano, 2012)

COMPONENTES	UNID. MED.	VERDE	MADURO
Calorías			
Valor Energético	Cal	28	32
Componentes Mayores			
Humedad	%	91,6	90.7
Proteína	g	0.8	0.5
Grasa	g	0.1	0.1
Carbohidratos Totales	g	6.9	8.3
Fibra	g	0.8	0.6
Minerales			
Calcio	mg	41.0	20.0
Fósforo	mg	22.0	13.0
Hierro	mg	0.3	0.4
Vitaminas			
Caroteno (A)	mg	trazas	110.0
Tiamina (B)	mg	0.04	0.03
Riboflavina (B2)	mg	0.04	0.04
Ácido Ascórbico	mg	36.0	46.0
Niacina (B5)	mg	0.2	0.3
Porción no Comestible			
Cáscara	%	18.0	25.0
Semillas	%	6.0	19.0

En Venezuela, se tienen dos importantes regiones productoras de lechosa, la del Sur del Lago de Maracaibo y la de Trujillo. Además en pequeña proporción se cultiva en los estados Anzoátegui, Aragua, Carabobo, Cojedes, Falcón, Lara,

Monagas y Portuguesa. Es importante destacar que dentro de las poblaciones de lechosa más cultivadas en el país están “Cartagena”, “Cubana”, “Paraguanera”, “Hawaiana”, “Roja” y “Maradol” (Lugo & Fuguet, 2004).

En la actualidad existe un gran interés en los compuestos naturales de la lechosa, ya que tienen propiedades medicinales. Algunos de estos componentes se utilizan ampliamente en la industria farmacológica, como lo son la carpaína, la papaína, la quimopapaína y el bencil isotiocinato. (Fundación del Desarrollo Agropecuario, 1998).

2.2. PAPAÍNA

La papaína es una enzima sulfhidrúlica, sabiendo que las enzimas son biocatalizadores que aceleran las reacciones químicas, estas moléculas proteínicas energizadas son necesarias prácticamente para todas las actividades bioquímicas que se llevan a cabo en el organismo, si no fuera por su acción catalítica la mayoría de las reacciones serían demasiado lentas para sostener la vida (Koolman & Rohm, 2004).

Ésta enzima se extrae comúnmente del látex de la papaya (*Carica papaya L*) donde se encuentra en una concentración aproximadamente de 10% (Badui, 2006). Uno de los primeros científicos en caracterizar a la papaína fue Balls, quien en 1937 logró aislar y cristalizar esta enzima, desarrollando un proceso para la purificación y el aislamiento de la papaína en el estado cristalino nativa a partir de látex fresco (Balls, Lineweaver, & Thompson, 1937). Sin embargo, este método fue posteriormente modificado por Kimmel & Smith en 1954, utilizando látex seco disponible en el mercado y ha sido el método clásico para la preparación de la papaína durante muchos años. (Fosado, 2011).

Actualmente, esta enzima se encuentra disponible de manera comercial y usualmente, se purifica mediante columnas de afinidad. Algunas de sus propiedades fisicoquímicas son: masa molecular de 23.350 Da, punto isoelectrico de 8.75 y coeficiente de extinción molar de 2.5 mL mg⁻¹ cm⁻¹ a 278 nm. La actividad óptima de la papaína se encuentra en un intervalo amplio de pH, entre 6.5 y 7.8, mientras que con respecto a la temperatura, un incremento muy elevado favorece la

desnaturalización y consecutivamente la proteína pierde su capacidad catalítica, por esta razón cada enzima tiene un intervalo óptimo de temperatura. Para la papaína el incremento de temperatura favorece su actividad enzimática, hasta llegar a la temperatura de máxima actividad que corresponde a 60 °C. A temperaturas mayores su actividad enzimática disminuye, hasta desnaturalizarse a más de 85°C. La papaína posee una alta termoestabilidad, 70% de actividad enzimática a 70°C, propiedad que la hace interesante como proteasa de alto espectro. (Villacrés, 2001).

La papaína pura, es una proteína constituida de 212 residuos aminoacídicos. Estos residuos se localizan enrollados en dos partes separadas por un puente que tiene un lugar activo con un grupo tiol (SH) libre de un residuo de cisteína, de ahí proviene su nombre de cistein-proteasa. Esta molécula es similar a la proteasa humana, se estabiliza debido a la presencia de puentes disulfuro formados por enlace de aminoácidos cisteína en su estructura. (Fosado, 2011)

A continuación se muestra la Figura N° 2, donde se tiene la Estructura cristalográfica de la papaína. Se observa a la derecha el dominio I predominantemente hélice α y a la izquierda el dominio II hoja β , así como residuos de aminoácidos responsables de la actividad.

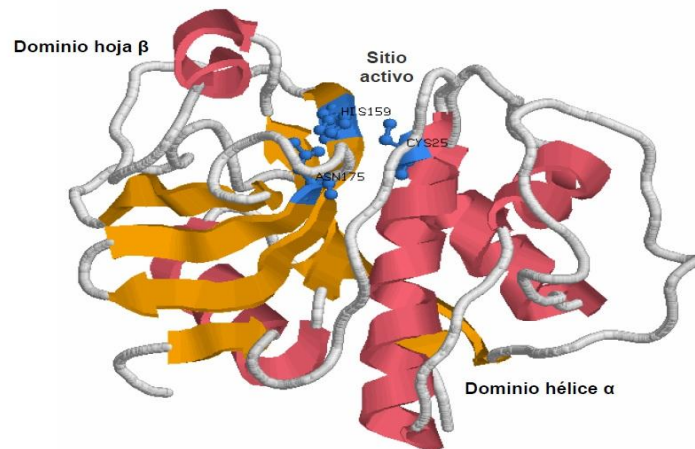


Figura N° 2. Estructura cristalográfica de la papaína. (Fosado, 2011)

La estructura tridimensional de la papaína ha sido determinada por cristalografía de rayos X a diferentes resoluciones. (Jurnak & Mcpherson, 1987) Uno

de sus dominios se caracteriza por tener estructura secundaria de tipo hélice α (residuos 10 a 111 y 208 a 212), mientras que el otro dominio está formado por giros y hojas β (residuos 1 a 9 y 112 a 207).

En su estado nativo, el interior de cada uno de sus dominios contiene cadenas de aminoácidos predominantemente no polares, no obstante en la interface también existen aminoácidos polares. La conformación en dos dominios estructurales es una característica común en las proteasas cisteínicas; sin embargo, el número de aminoácidos no polares presentes en la interface varía de manera considerable en cada uno de los miembros de esta familia. También, cerca de la interface se localizan los residuos de aminoácidos que conforman el sitio activo de esta macromolécula Cys25, His159 y Asn175. (Drenth, Jansonius, Koekoek, & Wolthers, 1971). En la Figura N° 3, se presenta la Estructura de la papaína.

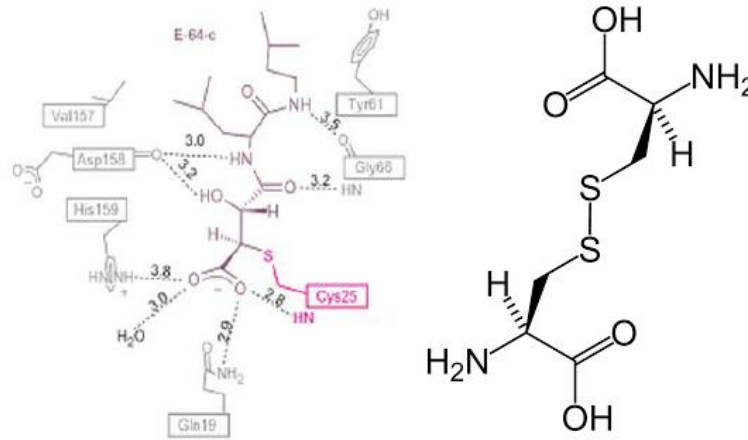


Figura N° 3. Estructura de la papaína. (Perry & Hegeman, 2007)

2.2.1. Aplicaciones Industriales

La papaína por ser una proteasa de origen vegetal, es capaz de hidrolizar el enlace peptídico de las proteínas; una de sus principales aplicaciones a nivel industrial es el ablandamiento de carne, gracias a su actividad sobre el tejido conectivo de colágeno y elastina teniendo menor preferencia por las proteínas de las fibras musculares. En algunos países era práctica común la inyección de soluciones de esta enzima en el sistema circulatorio de los animales antes de su sacrificio, con lo cual se logra que se distribuya de forma homogénea, ya que su acción provoca que

los tejidos se suavicen, por otra parte existen en el mercado diversos productos a base de papaína, cloruro de sodio y glutamato monosódico que se usan en las cocinas familiares para ablandar la carne; esta enzima es adecuada para este fin ya que actúa a bajas concentraciones y además, es muy estable a temperaturas altas. (Badui, 2006)

Otra aplicación importante es en la producción de cerveza. Durante el almacenamiento en frío después de la fermentación, la cerveza puede producir un enturbiamiento indeseable provocado parcialmente por la proteína propia de la materia prima empleada; la papaína en concentraciones bajas (10ppm) ayuda a evitar este problema ya que hidroliza los polipéptidos responsable del enturbiamiento.

En la industria cosmética es una enzima muy apreciada ya que se utiliza gracias a su poder desmanchador y cicatrizante. Por otra parte en la industria farmacéutica es empleada en la fabricación de medicinas para la digestión, reducir la hinchazón, fiebre y adhesiones post cirugía. (Villavicencio, 2011).

En la actualidad existen distintos métodos para comprobar la actividad de las enzimas proteolíticas entre los más conocidos están el método Sørensen, el Anson y el Balls y Hoover.

El método Sørensen, también conocido como titulación formólica, mide directamente la hidrólisis de una proteína-substrato realizada por una cantidad conocida de enzima. Durante este proceso las uniones peptídicas se rompen liberando grupos Carboxilos (-COOH) y Amina (-NH₂). Para hacer posible la titulación de los grupos carboxilos, los grupos básicos se bloquean con el aldehído fórmico.

Por otra parte se encuentra el método de Anson o también llamado método de la Hemoglobina, es uno de los más utilizados para estimar proteólisis. El substrato que es la hemoglobina desnaturalizada, se digiere bajo condiciones estándares. La proteína no digerida se precipita con ácido tricloroacético. La cantidad de proteína no precipitada se valora con reactivo fenólico. Al aplicarse este método para determinar papaína es necesario la presencia de un agente reductor, como cianuro, pues de otro modo la hemoglobina inactiva parte o toda la papaína, por oxidación. (SISIB, 2010)

Además se tiene el método Balls y Hoover o el método de coagulación de la leche, este método confía en la capacidad de la papaína en coagular la leche. La principal desventaja de este método radica en el hecho de no medir la proteólisis total, es decir, la hidrólisis de un substrato de proteína, por el contrario, mide la actividad de la coagulación de la leche. Sin embargo, la coagulación de la leche es una propiedad característica de los componentes proteolíticos de este grupo de enzimas por lo que puede ser usada con seguridad en la medición proteolítica. Esto ocurre gracias a que del total de las proteínas presentes en la leche un 80% es caseína, ésta una vez que pierde su solubilidad en la leche precipita, formando lo que comúnmente se denomina coágulos, esto también puede ocurrir por acción enzimática debido a la capacidad que tienen las enzimas proteolíticas de hidrolizar el enlace peptídico presente en la caseína. (SISIB, 2010).

2.2.2. Mercadeo de la Papaína (Fernández, 2005).

El crecimiento del negocio relacionado con la papaína ha venido en ascenso en los últimos años de tal manera que se calcula que entre el 50% y el 70% del mercado mundial corresponde a las industrias relacionadas a la alimentación. Por otro lado, todas las propiedades que contiene la papaína no han podido ser reproducidas en una enzima sintética, lo que la vuelve insustituible en muchas de sus aplicaciones.

Se estima que actualmente el mercado de la papaína fluctúa entre 900 y 1000 toneladas de esta enzima al año y el precio al que se vende la papaína altamente refinada es superior a los US\$100 por Kilogramo, pudiendo alcanzar un valor de US\$ 150 a 190 por Kilogramo, que es el precio medio dentro de esta enzima altamente refinadas.

2.3. MÉTODOS DE SEPARACIÓN

Las mezclas están compuestas por la unión física de dos o más sustancias, y frecuentemente existe la necesidad de obtener en forma pura alguno de esos componentes. Los métodos de separación se basan en diferencias entre las propiedades físicas de los componentes de la mezcla (Martínez, 2010), por ejemplo:

punto de ebullición, densidad, presión de vapor, solubilidad, etc. Entre los métodos de separación se tienen:

2.3.1. Filtración

Si la fase dispersa es insoluble y de grano relativamente grande, lo cual es característico de las suspensiones. El método de filtración consiste en una barrera, que puede ser de malla, fibra, material poros o un relleno sólido, que retiene el sedimento y el filtrado obtenido queda prácticamente libre.

2.3.2. Evaporación

Este método consiste en aprovechar que unas sustancias se evaporan cuando se exponen al aire o cuando se calientan moderadamente, mientras que otras no lo hacen, es decir, aprovecha las diferencias de punto de ebullición entre los componentes de la mezcla.

2.3.3. Destilación

Este método consiste en separar los componentes de las mezclas basándose en las diferencias en los puntos de ebullición de dichos componentes. Es el procedimiento utilizado para separar dos líquidos que se encuentran disueltos. Es importante señalar que un compuesto de punto de ebullición bajo se considera “volátil” en relación con los demás componentes de puntos de ebullición mayor. Los compuestos con una presión de vapor baja tendrán puntos de ebullición altos y los que tengan una presión de vapor alta tendrán puntos de ebullición bajos.

Los tipos de destilación más comunes son: la destilación simple, destilación fraccionada y la destilación por arrastre con vapor. En la *destilación simple*, el proceso se lleva a cabo empleando una sola etapa, es decir, que se evapora el líquido de punto de ebullición más bajo o mayor presión de vapor, y se condensa usando un refrigerante. En la *Destilación fraccionada* el proceso se realiza en múltiples etapas por medio de una columna de destilación en donde se llevan a cabo continuamente numerosas evaporaciones y condensaciones. Al ir avanzando a lo largo de la

columna, la composición del vapor es más concentrada en el componente más volátil y la concentración del líquido que condensa es más rica en el componente menos volátil. Por último en la *Destilación por Arrastre con Vapor* se hace pasar una corriente de vapor a través de la mezcla de reacción y los componentes que son solubles en el vapor son separados. (Cuevas, 2003).

2.3.4. Extracción

La extracción es un proceso de separación donde dos sustancias inmiscibles entre sí, se ponen en contacto a través de una inter-fase, y las sustancias a separar se disuelven en diferente proporción en las distintas fases según el grado de afinidad. (King, 1980).

La extracción es una operación unitaria de transferencia de materia basada en la disolución de uno o varios de los componentes de una mezcla (líquida o que formen parte de un sólido) en un solvente selectivo. Se diferencian según donde se encuentre la materia a extraer, en caso de estar en un sólido, corresponde a una extracción sólido-líquido, y de encontrarse en un líquido se denomina extracción líquido-líquido. En este último caso el disolvente debe ser inmiscible con la fase líquida que contiene el soluto. (Costa, Cervera, & col., 1984).

a) Extracción líquido-líquido:

La extracción de un componente de una mezcla líquida mediante un disolvente tiene ciertas ventajas ante el uso de la separación por destilación:

- ✓ Las instalaciones son más sencillas
- ✓ Es posible separar componentes sensibles al calor sin necesidad de hacer una destilación al vacío.
- ✓ La selectividad del disolvente para componentes de naturaleza química parecida permite la separación de grupos de componentes, imposibles de lograr basándose sólo en el punto de ebullición.

b) Extracción sólido-líquido:

Esta operación también recibe el nombre de *lixiviación, percolación o lavado*, dependiendo de las aplicaciones a la que se destine. Si se pretende eliminar un

componente no deseado de un sólido, se habla de *lavado*. Si el componente extraído posee un valor importante se denomina *lixiviación*. La palabra *percolación*, se refiere a la forma de operación (vertido de un líquido sobre un sólido), que al objetivo en sí. (Costa, Cervera, & col., 1984).

La extracción sólido-líquido es altamente empleada en las industrias químicas, este proceso se realiza por cargas en forma continua o semicontinua, con condiciones de operación por etapas o en continuo contacto. Para favorecer la extracción sólido-líquido se debe disminuir el tamaño de la partícula para aumentar el área de transferencia de masa, y favorecer la difusión, que es un proceso físico irreversible, en donde la transferencia de moléculas de un lugar a otro se lleva a cabo en un medio cualquiera por diferencia de concentración. (Welty, Wicks, & Wilson, 1998).

La extracción sólido-líquido es análoga a la operación de absorción. El disolvente contenido en las corrientes de extracto y refinado debe separarse y recircularse, para la economía de la operación; eso se consigue generalmente por destilación.

En la extracción sólido-líquido se acostumbra a trabajar por cargas o en semicontinuo, por la dificultad de manipulación del sólido que hay que someter a extracción. En la Figura N°4 se presenta un esquema de extracción sólido-líquido por contacto continuo.

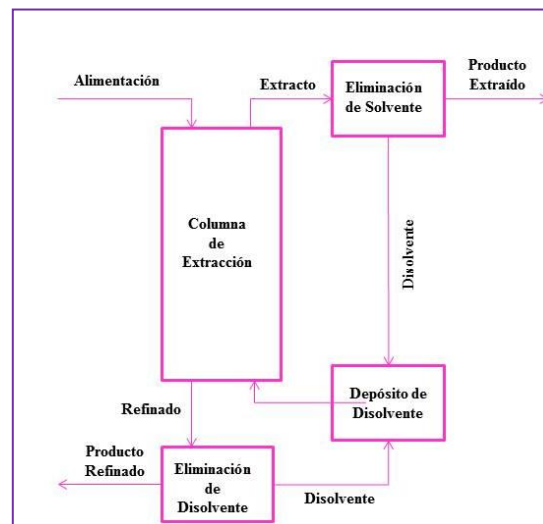


Figura N° 4. Extracción sólido-líquido por contacto continuo, con recuperación de disolvente. (Elaboración propia).

Al culminar el proceso de extracción (cuando se retira el material de extracción del solvente) aún existe cierta cantidad de solución (solvente y extracto) retenida en las partículas sólidas por fuerzas de adhesión. Es por esta razón que ningún proceso de extracción es completo.

2.3.5. Técnicas de Extracción

Actualmente, en la industria existen una gran variedad de métodos para realizar la separación de dos o más sustancias, esto depende de las propiedades fisicoquímicas de cada materia a utilizar y de la fuerza impulsora o principio a través del cual es más factible desarrollar el proceso. El mecanismo de extracción involucra dos fenómenos físicos, como lo son: la difusión, que se lleva a cabo a través de la pared celular y la convección que arrastra el contenido una vez que las paredes celulares se han roto. (King, 1980).

2.3.6. Extracción Continua

Para efectuar una extracción eficiente y “agotar” el material que se está extrayendo, generalmente se requieren volúmenes muy grandes del disolvente de extracción, es por ello que el costo y la manipulación de tales cantidades hacen impráctica la operación. En estos casos, es necesario el uso de aparatos que por su diseño ahorran tiempo y dinero.

2.3.7. Extracción tipo Soxhlet

Soxhlet es la técnica más antigua para la extracción de compuestos orgánicos en matrices sólidas. Desarrollada en 1879, es actualmente aceptada por la Agencia de Protección Ambiental (EPA), como método 3540C, y usada como procedimiento de referencia con respecto al que se validan otras técnicas más actuales. (Canosa M. , 2009).

Es un método de extracción continuo que se utiliza para materiales sólidos. Consiste en colocar el material a extraer en la cámara de extracción, conectada por una parte a un balón de destilación y por otra a un refrigerante. El disolvente

contenido en el balón se calienta hasta que ebulle, el vapor asciende por el tubo lateral y se condensa, cayendo gota a gota sobre el material que se le realiza la extracción. El disolvente caliente contacta con el sólido y empieza a producirse la transferencia de masa. Cuando alcanza el nivel conveniente de la altura de la cámara, éste es succionado por efecto sifón y devuelto al matraz inferior. El proceso se repite hasta conseguir el agotamiento deseado del material. (Lamarque & col., 2008).

A continuación, se muestra en la Figura N°5 el montaje del equipo de soxhlet empleado para realizar extracciones sólido-líquido.

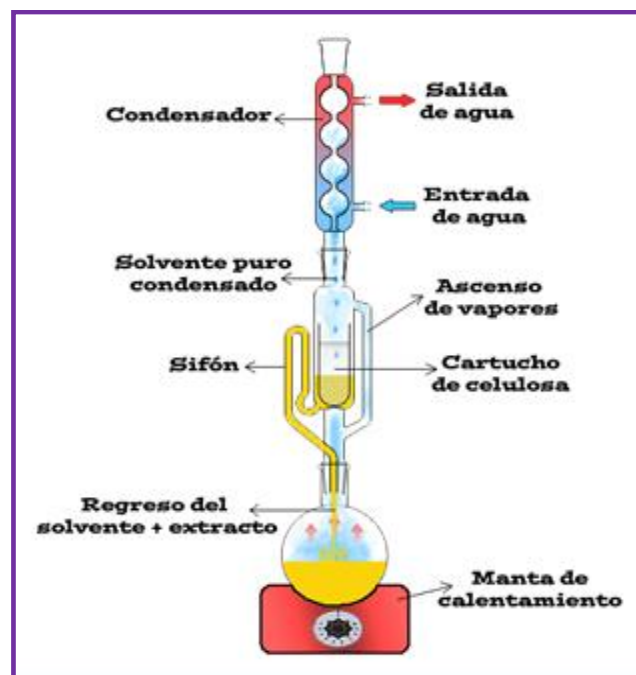


Figura N° 5. Extractor sólido-líquido. (Lamarque & col., 2008)

Las principales ventajas y desventajas del uso de esta técnica de extracción son las siguientes: (Landaeta & Orta, 2010).

Ventajas:

- ✓ El solvente puro y la muestra se encuentran en contacto directo en repetidas ocasiones, lo cual mejora la extracción.
- ✓ No requiere filtración posterior, quedando sólo el analito.
- ✓ Gran capacidad de recuperación del solvente.
- ✓ Poca complejidad para su uso.

Desventajas:

- ✓ El tiempo de operación normalmente es de 24 horas, por lo cual es un proceso lento.
- ✓ Se necesita gran cantidad de solvente.
- ✓ No se aplica a analitos que sus componentes se descompongan por la adición de calor.
- ✓ Necesidad de una etapa posterior de separación del solvente y el compuesto.

2.3.8. Extracción Asistida por Microondas (EAM)

Las microondas, son ondas de energía de alta frecuencia, imperceptibles al ojo humano y muy pequeñas, que viajan a la velocidad de la luz, constituyen el espectro electromagnético y su región se encuentra entre las ondas de radio y las de radiación infrarrojo del espectro. Una de sus características principales es producir cambios en la rotación molecular y en la movilidad iónica del medio sin alterar la muestra original.

La extracción asistida por microondas se basa en el uso de la energía de microondas para lograr que los compuestos de interés se trasladen de la muestra a un disolvente adecuado. Es una técnica rápida, que utiliza volúmenes pequeños de solvente y que permite el control de una serie de parámetros que afectan a la eficacia de la extracción. (Canosa M. , 2009).

El calentamiento inducido por la energía de microondas se fundamenta en la orientación de dipolos sometidos a una radiación electromagnética de frecuencia comprendida entre los 100 MHz y los 3 GHz. En presencia del campo electromagnético, los dipolos se orientan preferentemente en una determinada dirección, volviendo a un estado desordenado cuando el campo se extingue. La fricción entre moléculas causada por estos movimientos provoca la emisión de energía calorífica. A 2.5 GHz (frecuencia a la que operan los extractores de microondas), el alineamiento de moléculas polares seguido del correspondiente retorno al estado desordenado, ocurre aproximadamente a 5×10^9 veces por segundo, lo cual provoca un calentamiento sumamente rápido. (Canosa M. , 2009)

La aplicación de la energía de microondas puede llevarse a cabo en recipientes sellados (bajo control de presión y temperatura) o en vasos abiertos (presión atmosférica). En el primer caso, el disolvente puede calentarse por encima de su punto de ebullición a presión atmosférica, mientras que usando recipientes abiertos, la temperatura máxima alcanzada corresponderá a la del punto de ebullición del disolvente a presión atmosférica.

Los parámetros que afectan a la eficiencia de la extracción son la naturaleza del disolvente, la temperatura, la potencia, el tiempo de extracción y la naturaleza de la matriz. La temperatura ayuda a aumentar la difusividad de los analitos desde la matriz al disolvente. El efecto de la energía de microondas es fuertemente dependiente de la naturaleza del disolvente y de la matriz.

La cantidad de energía aplicada es un parámetro a controlar, debido a que puede producir un calentamiento excesivo de la muestra. El tiempo de extracción también es controlado, debido a que valores excesivamente largos podrían causar la degradación de los compuestos. (Canosa M. , 2009)

En el espectro electromagnético, la radiación microonda se encuentra en el área de transición entre la radiación infrarroja y las ondas de radiofrecuencia, como se muestra a continuación en la Figura N° 6. (Carballido, 2008)

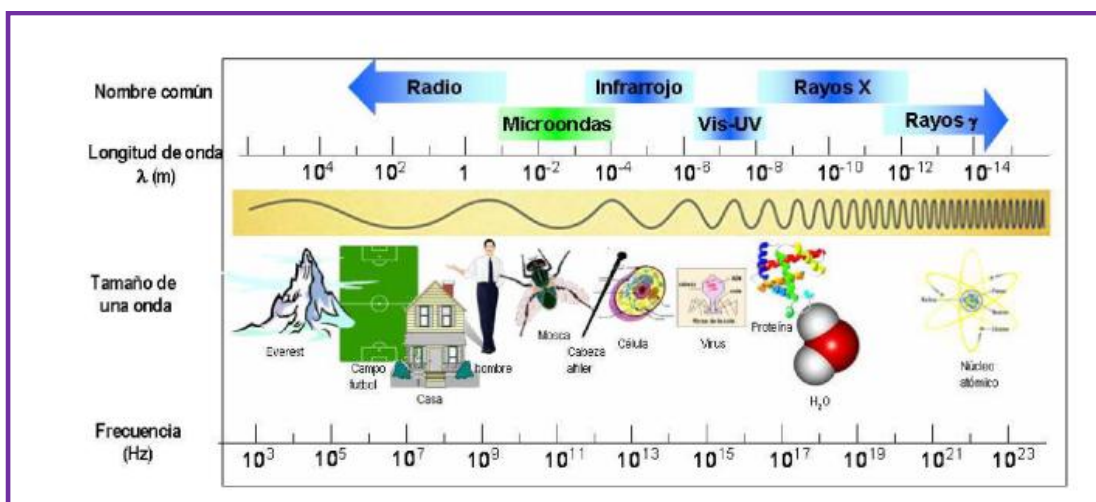


Figura N° 6. Espectro electromagnético. (Carballido, 2008)

La radiación microonda está constituida por un campo eléctrico y un campo magnético, aunque sólo el campo eléctrico transfiere la energía que conduce al calentamiento de las sustancias. (Carballido, 2008)

A continuación se presenta la Figura N°7 donde se observa los parametros en una onda electromagnética.

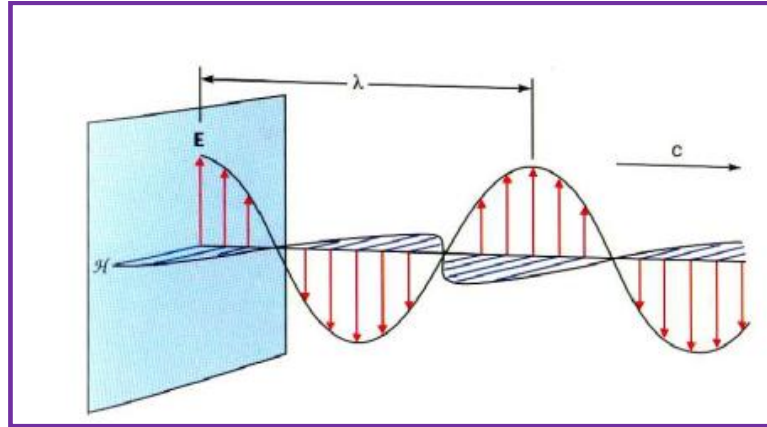


Figura N° 7. Onda electromagnética. (Carballido, 2008)

En donde:

E = Campo eléctrico

H = Campo magnético

λ = Longitud de onda (2.2 cm de 2450 MHz)

c = Velocidad de la luz (300 000 Km/s)

El equipo de microondas está constituido por un magnetrón, éste es un oscilador que convierte el pulso de alto voltaje en potencia. Además contiene una cavidad, en donde las ondas interactúan con el sistema. (ElKhorri, Pare, Bélanger, & Pérez, 2007).

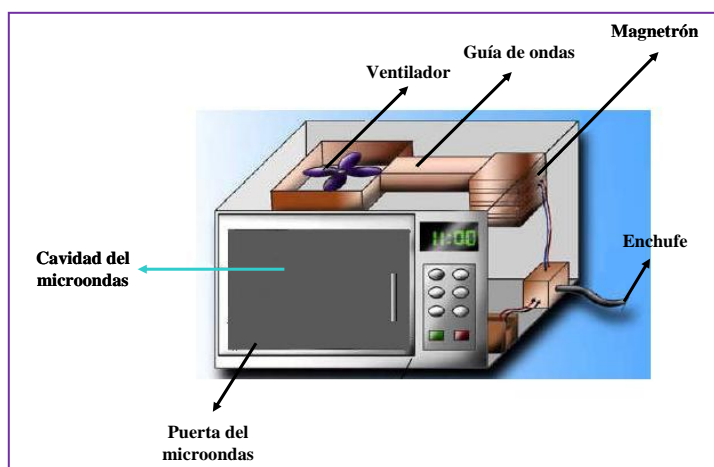


Figura N° 8. Modelo de equipo de Extracción Asistida por Microondas. (ElKhorí, Pare, Bélanger, & Pérez, 2007)

Esta técnica relativamente nueva ha generado cierto interés en el campo de los alimentos, debido a que la extracción es muy rápida y eficiente debido a la solubilidad de los solventes con la materia prima. El proceso de Extracción Asistida por Microondas posee varias ventajas, entre las cuales se encuentran las siguientes:

- ✓ Tiempos cortos de operación.
- ✓ Por el movimiento molecular, se presentan la agitación y la extracción simultáneamente.
- ✓ Bajo consumo de solvente.
- ✓ Se logran alcanzar altas temperaturas.
- ✓ Bajo consumo de energía.

Entre las desventajas principales que tiene esta técnica tenemos las siguientes:

- ✓ Necesidad de un proceso de filtración posterior a la extracción para separar el extracto de la materia prima.
- ✓ Existencia de puntos fríos y puntos calientes donde la radiación no es aplicada uniformemente.
- ✓ Sobrecalentamiento de la muestra. (ElKhorí, Pare, Bélanger, & Pérez, 2007).

En el proceso de Extracción Asistida por Microondas se debe tener en cuenta varios factores implicados: estos son (Mandal, Mohan, & Hemalatha, 2007).

2.3.8.1. Selección del Solvente

Es imprescindible que el solvente escogido sea soluble con el compuesto activo de la materia prima y tener una alta selectividad. Lograr una fácil separación del solvente con el compuesto activo, y que simultáneamente se trate de un proceso rentable son parámetros importantes para la selección del solvente.

2.3.8.2. Potencia

Se expresa en valor porcentual y es directamente proporcional a la temperatura alcanzada por el material vegetal. Emplear una alta potencia produce un rompimiento de la pared celular. Por otro lado, al realizar la extracción a baja potencia, la ruptura de la pared celular ocurre gradualmente, por lo que la extracción es más selectiva.

2.3.8.3. Tiempo de extracción

Es una variable importante en la extracción, ya que al aumentar el tiempo aumenta la cantidad de compuesto activo extraído, aunque puede ocurrir degradación de ciertos componentes de la materia prima. Para evitar esta degradación, se debe trabajar con tiempos cortos de extracción.

2.3.8.4. Tamaño de partícula

Tomado en cuenta el principio de transferencia de masa, en donde a menor tamaño de partícula, mayor es el área superficial por lo cual se beneficia este fenómeno. Por otro lado, el tamaño de partícula afecta el alcance de la microonda en el interior de la materia vegetal, la temperatura y la uniformidad del calentamiento. (Incropera & DeWitt, 1999).

2.3.8.5. Constante dieléctrica (ϵ'):

Describe la capacidad de una molécula a ser polarizada por un campo eléctrico; indica la capacidad de aumento de temperatura del material mediante

radiación de microonda. *El factor de pérdida dieléctrica* (ϵ''), describe la capacidad del material para disipar la energía eléctrica, expresa la eficiencia de conversión de microondas en calor. Es por ello que, los disolventes polares tales como agua, etanol y metanol se calientan con facilidad, al contrario de los disolventes no polares, como hexano y tolueno, en donde las microondas no tienen efecto. *El factor de disipación*, también llamado tangente de pérdida ($\tan \delta$), es una relación de la pérdida dieléctrica (ϵ'') a la constante dieléctrica (ϵ'). Expresa la capacidad de un material para absorber energía electromagnética.

Las moléculas polares y los ácidos absorben altamente las microondas por poseer una constante dieléctrica muy elevada, mientras que solventes no polares como el hexano o el tolueno casi no absorben energía por poseer una constante dieléctrica muy baja. (Arias & López, 2013). Seguidamente se presenta la Tabla N° 2 las constantes dieléctrica y factor de disipación de solventes más usados para extracciones.

Tabla N° 2. Constantes dieléctricas y factor de disipación de solventes más usados para extracciones.

Solvente	Polaridad	Punto de ebullición (°C)	Constante dieléctrica a 25 °C	Momento dipolar a 25 °C
Metanol	Polar	65.00	32.70	1.70
Etanol (99,98%)	Polar	78.30	24.50	1.69
I-Propanol	Polar	82.00	17.90	1.66
Agua destilada	Polar	100.00	80.10	1.82
Acetona	Polar	56.00	20.70	2.85
Acetato de etilo	No Polar	77.00	6.02	1.88
Hexano	No Polar	69.00	1.89	0.00

2.3.8.6. Mecanismos de extracción asistida por microondas. (Zhuoyan, 2010).

A continuación se enumeran los mecanismos para realizar la extracción de un soluto de una muestra usando microondas:

- a) *Mecanismo I:* la muestra se sumerge en un disolvente o mezcla de disolventes que posean la propiedad de absorber altamente la energía de las microondas y producen un calentamiento.
- b) *Mecanismo II:* es posible extraer la muestra combinando disolventes polares que absorban las microondas y no polares que extraigan el soluto.
- c) *Mecanismo III:* se emplean disolventes transparentes a las microondas para extraer el soluto. Esto se emplea a las muestras que por sí solas son capaces de absorber la energía de microondas, sobre todo aquellas con un elevado contenido de agua.

2.3.9. Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU)

El ultrasonido es utilizado por la posibilidad de realizar evaluaciones no invasivas ni destructivas, y por ser fuente de energía, según el Centro de Sonoquímica de la Universidad de Coventry en Reino Unido. El ultrasonido provee una excelente forma de energía para la modificación de las reacciones químicas, y mucho más eficiente que las normalmente usadas (temperatura y luz). Esta herramienta se denomina Sonoquímica. Los ultrasonidos son formas de energía de alta frecuencia que son imperceptibles por el oído humano. Son vibraciones que se desplazan en un medio causando compresión y expansión del material. (Mason, 1999).

2.3.9.1. Aplicaciones del ultrasonido

Las aplicaciones del ultrasonido pueden dividirse en ultrasonido de señal y de potencia.

Ultrasonido de señal (100 kHz a 1MHz): se emplean para monitorear un proceso o la obtención de un producto específico, son señales de baja intensidad. Algunos

ejemplos de su aplicación en la industria alimenticia son, medida del grosor de cáscaras de huevos, detección de agujeros en quesos y papas, medición de estado de maduración de algunas frutas y legumbres, determinación de propiedades reológicas en quesos, propiedades de texturas en frutas y determinación de edad de huevos y papas. (Mulet, Benedito, Bon, & San Juan, 1999)

Ultrasonido de Potencia (18-100 kHz): son señales de alta intensidad que se utilizan para modificar un proceso o un producto. Con una frecuencia más baja y mayor potencia producen cambios físicos y químicos en el medio a través de la generación y luego el colapso de burbujas de cavitación, las cuales se forman, crecen y posteriormente colapsan dentro del líquido. Se requiere de un disolvente líquido, un generador de energía y un transductor, que convierte la energía eléctrica en energía acústica. (Mulet, Benedito, Bon, & San Juan, 1999).

Se sabe que esta técnica posee un gran potencial para su uso en una gran variedad de procesos, aunque actualmente no han sido ampliamente explotados. Algunos usos del ultrasonido de potencia son:

- a) Limpieza y desinfección por remoción de contaminación biológica, debido al colapso cavitacional logra alcanzar puntos que los métodos convencionales de limpieza no consiguen. Aumenta la eficiencia de desinfectantes como el cloro. (Mason, 1999).
- b) Mezclado y emulsificación para bases de sopas y salsas, que al pasar por el homogeneizador ultrasónico tienen una textura más suave. (Mason, 1999).
- c) Impregnación de pigmentos en cueros.
- d) Deshidratación del arroz, zanahorias, cebolla y deshidratación osmótica de manzana. (Mulet, Benedito, Bon, & San Juan, 1999).
- e) Extracción de solventes a partir de material vegetal, basándose en la correcta elección del disolvente y condiciones como temperatura y agitación, aumentando la eficiencia en la extracción por solvente de compuestos orgánicos en materiales vegetales. (Mason, 1999).

2.3.9.2. Principio Básico del Ultrasonido:

La extracción asistida por ultrasonido se basa en el uso de sonidos de alta frecuencia, con el fin de desprender el compuesto buscado del material vegetal. Las partículas sólidas y líquidas vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica, como resultado el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al solvente. (Gao & Liu, 2005).

El ultrasonido produce fenómenos de cavitación cuando la potencia acústica de entrada es suficientemente alta para permitir que múltiples microburbujas se produzcan en sitios de nucleación del fluido. Las burbujas crecen durante la fase de enrarecimiento de la onda del sonido y posteriormente colapsan durante la fase de compresión. Todo el proceso de nucleación de burbujas de gas, desde el crecimiento y hasta el colapso debido a la acción de las ondas sonoras intensas se denomina cavitación.

El colapso de las burbujas convierte la energía sonora en energía mecánica en la forma de ondas de choque equivalente a varios miles de atmósferas (300 MPa) de presión. Un factor adicional que aumenta la rotura celular son las microcorrientes (gradientes altos de velocidad que causan tensión de corte), que se producen cerca de las burbujas que vibran por el ultrasonido.

El efecto mecánico del ultra sonido acelera la liberación de compuestos orgánicos contenidos dentro del cuerpo de la planta mediante el rompimiento de las paredes celulares, lo cual mejora la transferencia de masa, y facilita el acceso al disolvente al contenido de la celda. Este efecto más fuerte a frecuencias bajas (18-30 KHz), y prácticamente insignificantes en 400-1000 KHz, comparados para la misma intensidad de la onda. EAU ha demostrado ser una técnica versátil que se ha ampliado con gran beneficio para la producción industrial ya que proporciona extractos más puros y rendimientos más altos, en tiempos más cortos y que trabajan a temperaturas más bajas. (Chemat & Strube, 2015).

“En los ciclos de baja presión, las ondas producen burbujas de vacío o huecos en el líquido. Cuando estas alcanzan un volumen al que no pueden absorber más energía, colapsan violentamente en el ciclo de alta presión. Este fenómeno se llama

cavitación.” (Arias & López, 2013). A continuación en la Figura N°9 se presenta la generación de burbujas en el líquido

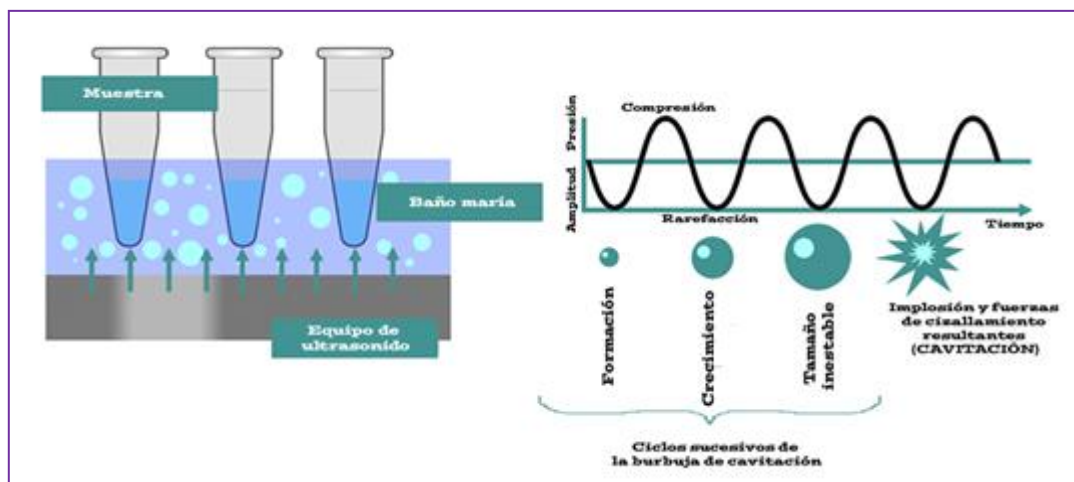


Figura N° 9. Generación de burbujas en el líquido. (Arias & López, 2013)

2.3.9.3. Optimización del método

Las variables que se deben analizar para optimizar la técnica de extracción asistida por ultrasonido son temperatura, solvente, volumen del solvente, tiempo de extracción, tamaño de la muestra de prueba, poder del ultrasonido y duración del ciclo aplicado. (Palma & Barroso, 2001).

2.3.9.4. Ventajas y Desventajas de la Extracción Asistida por Ultrasonido:

A continuación, se presenta en la Tabla N° 3 las ventajas y desventajas de la Extracción por EAU.

Tabla N° 3. Ventajas y desventajas de la Extracción por EAU. (Arias & López, 2013)

Ventajas	Desventajas
Rápido y sencillo	Requiere filtrado después de la extracción.
Control de todos los parámetros de extracción	No todos poseen control de T y f.
No perjudica el ambiente	
Económico	

2.4. DISOLVENTES Y SOLUBILIDAD

Un disolvente en términos prácticos, es aquel compuesto capaz de romper una red cristalina, es decir, que puede competir con las fuerzas intermoleculares que mantienen unidas las moléculas de un sólido, o bien que se trata de una sustancia en el seno de la cual otro compuesto dado no precipitará. En ambos casos se habla de fuerzas intermoleculares entre disolvente y soluto, más fuertes que aquellas existentes dentro del propio soluto. Si las fuerzas que mantienen la red cristalina del soluto son mayores que las que lo unen al disolvente, el soluto precipitará; si son más débiles, el compuesto cristalino se disolverá. (Durst & Gokel, 1985).

Generalmente, la solubilidad de un soluto en un disolvente se ha basado en el principio de “*Simillis, simillimus solutum*”, que significa “lo semejante disuelve a lo semejante”. Al referirse a disolventes, y las fuerzas que existen entre ellos y los solutos, se habla de dos clases generales de moléculas, aquellas que son hidrófilas, las cuales poseen afinidad por el agua, y las que son hidrófobas, aquellas que no tienen dicha afinidad. Pero en general, las fuerzas de solvatación son las de enlace de hidrógeno, fuerzas de London y fuerzas de Lewis, y sirven para definir la mayor parte de los tipos de disolventes orgánicos e inorgánicos.

Debido a que en una molécula existe un momento dipolar apreciable, se puede predecir que cada extremo de un enlace entre elementos distintos tendrá una carga parcial. El extremo positivo (menos electronegativo) del dipolo presentará afinidad por el extremo negativo (más electronegativo) de una molécula similar (interacción dipolo-dipolo) y viceversa. El extremo negativo de un dipolo tenderá a asociarse con un ion positivo, mientras que el extremo positivo se asociará con un anión. Este tipo de atracciones suelen denominarse interacciones ion-dipolo. (Durst & Gokel, 1985).

Entre los disolventes tradicionales, el agua tiene el dipolo más elevado; los alcanos típicos como el hexano o el pentano tienen el menor. En este amplio intervalo se sitúan los disolventes apolares como el tetracloruro de carbono, cloroformo, diclorometano, sulfuro de carbono, 1,2-dicloroetano, clorobenceno y otros compuestos clorados similares. Además, los hidrocarburos de uso frecuente como pentano, hexano, heptano, benceno, tolueno, xileno y etilbenceno tienen todos unos

momentos dipolares relativamente bajos. Entre los compuestos que tienen momento dipolar algo mayor, pero que todavía son esencialmente disolventes no polares, están los éteres, como el éter dietílico, tetrahidrofurano y dioxano.

En contraste con estos disolventes apolares se encuentran sustancias inorgánicas como el agua, amoníaco líquido y ácido sulfúrico, que tienen momento dipolar elevado y son buenos disolventes de sustratos inorgánicos. Los disolventes como el metanol o el etanol ofrecen la capacidad de formar enlaces de hidrógeno y ceder pares de electrones, como el agua, pero además poseen un extremo lipófilo (afinidad por los medios orgánicos) que puede ayudar a la solvatación de sustratos orgánicos. Debido a esta combinación de propiedades, los disolventes como el alcohol etílico pueden considerarse como lo mejor, bajo todos los conceptos. El que la reacción tenga lugar o no depende del par de reactivos específicos y de la efectividad para solvatare en un medio particular. (Durst & Gokel, 1985).

Los disolventes como el metanol y el etanol que contienen protones disociables se denominan disolventes próticos, esto se debe a que contienen hidrógeno unido a oxígeno o nitrógeno, de modo que son lo suficientemente ácidos como para formar puentes de hidrógeno.

Por otro lado, los disolventes apróticos, son disolventes polares de constante dieléctrica moderadamente elevada y que no contienen hidrógenos ácidos. Éstos disuelven compuestos iónicos, pero al hacerlo su acción difiere de un modo muy importante a los disolventes próticos ya que son incapaces de formar puentes de hidrógeno con los aniones. Estos disolventes apróticos son altamente polares, con momentos dipolares varias veces mayores que el agua. Los pares de electrones no compartidos de estos átomos muy expuestos, cargados negativamente, pueden solvatar los cationes muy frecuentemente. (Morrison & Boyd, 1998).

2.5. CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS QUÍMICO

Con el objeto de identificar y cuantificar la composición química de los compuestos contenidos en una mezcla de sustancias se emplean los métodos y

técnicas de caracterización química. Entre los métodos más usados se tiene la Espectroscopia de Infrarrojo que se empleó en este trabajo de investigación.

2.5.1. Espectroscopia de Infrarrojo (IR)

Esta espectroscopia emplea la radiación infrarrojo y se utiliza para determinar tipos de enlace y grupos funcionales en compuestos orgánicos. Aplica una radiación con longitudes de onda de 2 a 15 micrómetros o frecuencias de 5000 a 670 cm^{-1} . (Bailey & Bailey, 1998).

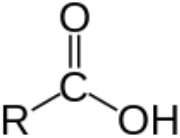
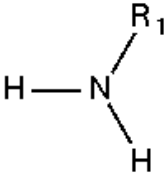
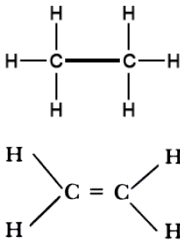
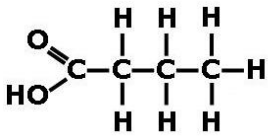
Un espectrómetro de infrarrojo somete la muestra a analizar a una radiación infrarroja en la banda de longitudes de onda de 2 a 15 micrómetros. Esta región se puede describir en términos de número de onda (frecuencia), de 5000 cm^{-1} a 670 cm^{-1} , que se refiere al número de ciclos en una distancia de un centímetro. Esta radiación es débil y no causa ninguna alteración permanente en una molécula, sin embargo, suministra energía suficiente para que ocurra una vibración longitudinal. Debido a que los distintos enlaces y grupos funcionales absorben energía a frecuencias diferentes, los espectros en el infrarrojo se aplican comúnmente en la determinación de los diferentes grupos funcionales que hay en una molécula. Por ejemplo, un triple enlace carbono-carbono es más fuerte que un doble enlace y requiere una radiación de frecuencia más alta (mayor energía) para vibrar en forma longitudinal. Se aplican los mismos parámetros a los enlaces carbono-oxígeno y carbono-nitrógeno. Con la respuesta específica de los enlaces presentes en la molécula se genera una curva de transmitancia en función de la longitud de onda, permitiendo identificar los compuestos puros, pero sobre todo los grupos funcionales contenidos en una muestra. Por esto la Espectroscopia de Infrarrojo permite el análisis de polímeros, aditivos, contaminantes ambientales y diversas áreas de industria química y medicina. (Bailey & Bailey, 1998).

Cada compuesto químico tiene asociado un espectro infrarrojo característico, donde los picos de absorción corresponden a determinadas energías de vibración de los enlaces químicos presentes. En si cada molécula presenta un espectro IR

característico (huella dactilar), debido a que todas las moléculas, excepto las especies diatómicas homonucleares como O₂ y Br₂, tienen algunas vibraciones que, al activarse, provocan la absorción de una determinada longitud de onda en la zona del espectro electromagnético correspondiente al infrarrojo, por lo que esta técnica permite detectar la presencia, en el material analizado, de diferentes impurezas.

A continuación se presenta en la Tabla N° 4 las frecuencias en donde se encuentran los compuestos químicos característicos de la estructura de la papaína.

Tabla N° 4. Grupos funcionales de interés presentes en la estructura de la papaína y sus señales características

Compuesto	Estructura	Región de Absorción (frecuencia, cm ⁻¹)
Ácido Carboxílico		-OH: 3300-2500 (e) -OH: 950-910 (f) C=O: 1760-1690
Aminas Primarias		-NH: 3400-3250 (e) -NH: 1650-1580 (f) -NH: 910-665 (f)
Alcanos/Alquenos		C-H: 3000-2850 (e) =C-H: 3100-3000 (e) C-H: 1470-1350 (f) =C-H: 1000-650
Ácidos Grasos		C=O: 1750-1715

CAPITULO III

METODOLOGÍA

El marco metodológico es el procedimiento a seguir para alcanzar el objetivo de la investigación, en este capítulo se detallan cada uno de los aspectos relacionados con la metodología que se empleó en este Trabajo Especial de Grado. A continuación se presenta un breve esquema (Figura N°10) y posteriormente se describe la metodología que se utilizó.

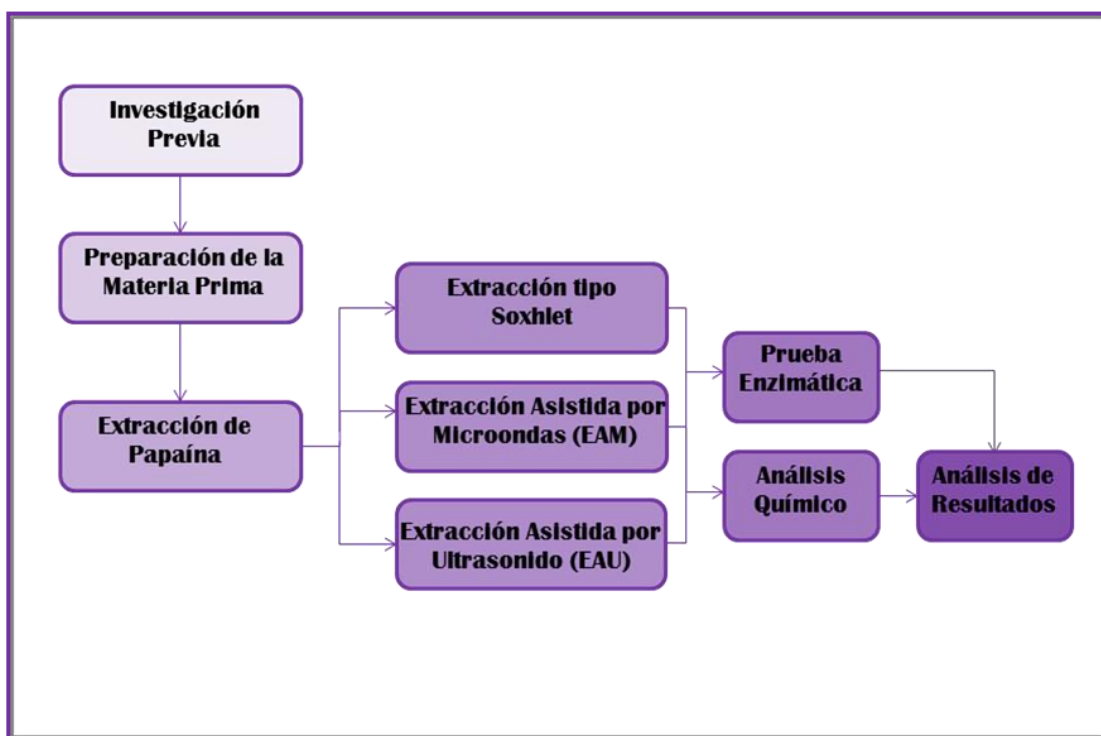


Figura N° 10. Esquema general de metodología (Elaboración propia).

3.1. INVESTIGACIÓN PREVIA

Se realizó una revisión bibliográfica de trabajos ya ejecutados, referentes a extracción de compuestos de interés, contenidos en diversas materias vegetales, datos de interés sobre la materia prima utilizada, la enzima, los tipos de enzima existentes, sus diversos usos y las técnicas de extracción que se emplearon, con el fin de sustentar teóricamente la presente investigación.

3.2. PREPARACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

Antes de comenzar la extracción se preparó la materia prima, que fue obtenida en el mercado de Coche de la ciudad de Caracas, mediante el siguiente procedimiento.

- a) Se seleccionaron las semillas de la lechosa de la fruta madura.
- b) Posteriormente se limpiaron las semillas para eliminar restos de pulpa de fruta, para luego pesarlas. Las semillas seleccionadas se aglomeraron en grupos de 10 gramos cada uno.

3.3. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD QUE CONTIENEN LAS SEMILLAS DE LECHOSA (Ferrer, Gutiérrez, & Velásquez, 2009).

Debido a que las semillas contienen cierta cantidad de agua, se procedió a calcular la cantidad de humedad presente en ellas, para posteriormente poder calcular el porcentaje de rendimiento en base seca, esto se realizó a través del siguiente procedimiento.

- a) Se tomaron 10 gramos de semillas húmedas para someter a secado en estufa, que posteriormente fueron pesadas hasta que no se notaron variaciones de peso de las semillas en la balanza, donde se tomó nota de la masa de las semillas secas cada 24 horas. Este procedimiento se realizó por triplicado, para obtener un promedio, que asegure una buena medición del porcentaje de humedad.

b) Con los datos obtenidos, se construyó la curva de Humedad en función del Tiempo y se determinó el valor de humedad promedio contenido en las semillas, como aquel valor constante en el tiempo.

c) Se calculó el porcentaje de Materia Seca con la siguiente ecuación:

$$\%MS = \frac{\text{masa muestra seca (g)}}{\text{masa de muestra húmeda (g)}} \times 100$$

(Ecuación N°1)

d) Se calculó el contenido de humedad por diferencia:

$$\%Humedad = 100 - \%MS$$

(Ecuación N°2)

3.4. EXTRACCIÓN DE LA PAPAÍNA

La extracción de la papaína contenida en las semillas de la lechosa se realizó mediante los métodos de Extracción Convencional tipo Soxhlet, Extracción Asistida por Microondas (EAM) y Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU).

3.4.1. Extracción convencional tipo Soxhlet

La Extracción Convencional tipo Soxhlet, se utilizó para determinar la condición más adecuada de humedad de las semillas y el solvente más eficiente. Para la determinación de los parámetros anteriores, se utilizó el equipo Soxhlet, ubicado en el Laboratorio de Bioquímica y Microbiología (Módulo III) de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad Central de Venezuela (EIUCV), el cual se presenta en la Figura N°5 (capítulo II).

3.4.1.1. Relación semilla/solvente (% p/v).

En este Trabajo Especial de Grado se utilizó para cada una de las extracciones, una relación de semilla/solvente (expresadas en % p/v) de 1:15 determinado por la pasantía de investigación realizada por (Febres & Guerra, 2013).

3.4.1.2 Evaluación del efecto del porcentaje de humedad.

En este estudio se comparó el efecto del agua contenida en las semillas, en el proceso de extracción de papaína, siguiendo el procedimiento realizado en el Trabajo de Grado de (Arias & López, 2013). Para ello se sometieron a extracción tres grupos de semillas, uno tomado de las semillas de la lechosa (húmedas), otro tras un proceso de deshidratación en estufa por 16 horas (parcialmente húmedas) y por último un grupo después de un proceso de deshidratación en estufa por 72 horas (secas).

Las extracciones de todos los grupos se realizaron por triplicado, empleando agua destilada como solvente, luego se compararon los porcentajes de rendimiento, de cada extracción. Todas las pruebas se realizaron usando el equipo presentado en la Figura N°5 y espacios descritos anteriormente siguiendo la metodología presentada a continuación.

a) Se tomó una muestra de semillas deshidratadas en la estufa por 72 horas a una temperatura de 55 °C (temperatura preestablecida por la estufa disponible en el laboratorio) para eliminar la mayor cantidad de agua posible.

b) Se realizó el montaje del equipo Soxhlet, ajustando la potencia en 30% en la manta de calentamiento, tomado como referencia de *Arias y López*, para lograr la evaporación de solvente dentro del equipo y se abrió el paso de agua para condensar el solvente sobre la muestra de semillas.

c) Se colocó en el equipo una carga de 10 gramos de semillas deshidratada, con un volumen de solvente de prueba equivalente a la relación de semillas/solvente señalada en el punto 3.4.1.1. El proceso de extracción se llevó a cabo durante 24 horas continuas, contadas a partir de la primera gota de solvente condensado.

d) Pasadas las 24 horas se procedió al desmontaje del equipo. Después de la extracción, la materia vegetal (residuo) se llevó a cabo el secado en estufa por 72 horas, tiempo en el cual se garantiza la estabilidad del peso de la muestra, a 55°C para eliminar el solvente aún presente.

e) Tras el secado del residuo por 72 horas después de la extracción, se determinó el porcentaje de rendimiento en base seca, es decir, la masa inicial por el porcentaje de masa seca calculado en la ecuación 1, de acuerdo a la ecuación N°3, presentada a continuación.

$$\%R = \left[\frac{\text{masa}_{\text{inicial}}(\text{g}) - \text{masa}_{\text{final}}(\text{g})}{\text{masa}_{\text{inicial}}(\text{g})} \right] \cdot 100 \quad (\text{Ecuación N}^\circ 3)$$

Dónde:

$\text{masa}_{\text{inicial}}$: masa antes de la extracción en base seca (g).

$\text{masa}_{\text{final}}$: masa después de extracción y secado en estufa (g).

%R: gramos de papaína obtenida por cada 100 gramos de semillas (rendimiento).

f) El extracto obtenido se envasó en frascos de vidrio color ámbar y sellados, para evitar la degradación y oxidación de los compuestos. Las muestras se dejaron enfriar en un recipiente para evitar que absorban humedad del medio ambiente, y posteriormente se refrigeraron inmediatamente, para evitar su degradación antes de la caracterización.

Para la extracción de papaína de las semillas frescas (no sometidas a deshidratación) y del grupo tras secado en la estufa por 16 horas, se pesaron 10 gramos de semilla de lechosa, luego se repitieron los pasos (b) al (f).

La metodología anterior, se repitió por triplicado para cada una de las características de humedad en estudio (semillas húmedas, semillas parcialmente húmedas en estufa por 16 horas y semillas deshidratadas en estufa durante 72 horas).

La mejor condición de humedad fue aquella cuyo porcentaje de rendimiento obtenido mediante la ecuación N°3, sea el valor más elevado.

3.4.1.3. Evaluación del solvente. (Arias & López, 2013)

En este estudio se analizó el efecto de distintos solventes, en el proceso de extracción de papaína. Para ello se sometió a extracción la muestra de semilla con la condición de humedad determinada anteriormente, con los distintos solventes en estudio de diferentes polaridades y comúnmente empleados en la industria alimenticia: etanol, acetato de etilo y n-hexano. Las extracciones se realizaron por triplicado para cada solvente. Seguidamente, se compararon los porcentajes de rendimiento obtenidos en cada extracción. Todas las pruebas se realizaron usando el equipo mostrado en la Figura N°5 (capítulo II), siguiendo el procedimiento presentado a continuación.

a) Se tomó una muestra de semilla en las condiciones de humedad establecidas de acuerdo al procedimiento 3.4.1.2.

b) Se realizó el montaje del equipo Soxhlet, ajustando la potencia en la manta de calentamiento, para lograr la evaporación del solvente dentro del equipo y abriendo el paso de agua para condensar el mismo sobre la muestra de semillas.

c) Se colocó en el equipo una carga de 10 gramos de materia vegetal, con un volumen de solvente equivalente a la relación de semilla/solvente ya establecida en el punto 3.4.1.1. El proceso de extracción se llevó a cabo durante 24 horas continuas, contadas a partir de la primera gota de solvente condensado.

d) Pasadas las 24 horas se procedió al desmontaje del equipo. Después de la extracción, la materia vegetal (residuo) se llevó a secar en estufa por 24 horas a 55 °C para eliminar el solvente aún presente.

e) Tras el secado del residuo después de la extracción, se determinó el porcentaje de rendimiento en base seca a partir de las masas de la extracción, de acuerdo a la ecuación N° 3.

f) Se tomó una muestra del extracto obtenido y se colocó en frascos de vidrio color ámbar y sellados, para evitar la degradación por oxidación de los compuestos. Las muestras se refrigeraron para evitar degradaciones antes de su caracterización.

La metodología anterior, se realizó por triplicado para cada uno de los solventes estudiados en este Trabajo Especial de Grado (etanol, acetato de etilo, n-hexano). El mejor solvente seleccionado fue el que obtuvo el mayor porcentaje de rendimiento.

3.4.2. Extracción Asistida por Microondas (EAM).

La Extracción Asistida por Microondas (EAM) se empleó con el fin de determinar el tiempo de exposición máximo y la mejor potencia para obtener el mayor rendimiento por el método de microondas. Para la determinación de los parámetros anteriores se utilizó un equipo de microondas comercial, marca SHARP® modelo Carousel R-520LW presentado en la Figura N°11, ubicado en el Módulo III de la EIUCV. Las pruebas se realizaron siguiendo la metodología presentada a continuación, basada en el Trabajo de Grado de (Arias & López, 2013).



Figura N° 11. Equipo microondas marca Sharp modelo R-520L (Fuente Propia)

3.4.2.1. Determinación del tiempo de extracción. (Arias & López, 2013)

a) Este estudio se empleó para determinar el tiempo de exposición máximo de las semillas con el solvente, evitando que el mismo llegue a ebullición, para prevenir la evaporación y pérdida del solvente, así como evitar cualquier descomposición que pueda sufrir el extracto.

b) Se seleccionó como solvente el obtenido en el método de extracción Convencional tipo Soxhlet del procedimiento 3.4.1.3, y la condición de humedad determinada en el procedimiento 3.4.1.2.

c) Se colocó dentro del microondas un vaso de precipitados con una carga de 10 gramos de semillas junto con un volumen de solvente equivalente a la relación semillas/solvente, establecida.

d) Se determinó el tiempo de extracción operando el equipo al 100% de potencia, midiendo la temperatura de la muestra cada 5 segundos, hasta que aparecieron las primeras burbujas de ebullición del solvente. La temperatura se midió cada 2 segundos debido al corto tiempo en el cual ocurre la ebullición y posterior evaporación del solvente, tanto con termómetro de bulbo, como con termómetro infrarrojo. La temperatura de ebullición de la muestra, se comparó con la temperatura de ebullición del solvente puro que se encuentra reportada en la bibliografía.

Este tiempo fue definido como el tiempo a utilizar para el resto de las pruebas.

3.4.2.2. Determinación de la mejor potencia.

a) Se seleccionó como solvente el obtenido en el método de extracción Convencional tipo Soxhlet del procedimiento 3.4.1.3, a su vez se seleccionó la condición de humedad determinada en el procedimiento 3.4.1.2.

b) Se colocó dentro del microondas un vaso de precipitados con una carga de 10 gramos de materia vegetal junto con la cantidad de solvente equivalente a la relación soluto/solvente establecida, utilizando el tiempo máximo determinado en el punto 3.4.2.1, a un 100% de potencia.

c) La muestra se filtró para separar la materia vegetal del solvente.

d) Las semillas (residuo) se llevaron a la estufa por 72 horas para secarlas adecuadamente, para posteriormente medir el rendimiento a través de la ecuación N°3.

e) El extracto obtenido fue envasado en frascos de vidrio color ámbar y sellados, para ser refrigerados inmediatamente.

f) Los pasos (a) al (d) se repitieron por triplicado haciendo un barrido de potencia que varía en 10% por experimento para comparar los rendimientos en base seca obtenidos con cada variación de la potencia (entre 20% y 100%).

La potencia seleccionada como la mejor fue la que reportó el mayor valor de rendimiento del extracto obtenido.

3.4.3. Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU)

Se realizó la Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU), donde se utilizó el equipo de ultrasonido de marca Elmasonic, modelo D-78224 SINGEN/HTW, el cual opera a una potencia de 500 Watts con una frecuencia de 60 Hz. El equipo está ubicado en el Módulo III de la EIUCV y se muestra en la Figura N° 12.



Figura N° 12. Equipo de Ultrasonido marca Elmasonic modelo D-78224

Todas las pruebas se realizaron utilizando el equipo descrito anteriormente siguiendo la metodología mostrada en el Trabajo de Grado de (Arias & López, 2013) descrita a continuación:

- a) Se seleccionó como mejor solvente el obtenido en el método de extracción Convencional tipo Soxhlet del procedimiento 3.4.1.3, y se

seleccionó la condición de humedad determinada en el procedimiento 3.4.1.2..

- b) Se trabajó con la relación soluto/solvente establecida. (Febres & Guerra, 2013)
- c) Se tomó una carga inicial de semillas de 10 gramos manteniendo constante la cantidad de masa utilizada en cada técnica de extracción.
- d) Se realizó un barrido de tiempo de residencia (10, 20 y 45) minutos y de temperatura (30 y 60) °C, los cuales son los valores estándar que posee el equipo de ultrasonido y los más usados en procesos de extracción. (Arias & López, 2013).
- e) Se filtró la muestra para separar las semillas del solvente, y el extracto obtenido fue envasado en frascos de vidrio color ámbar y sellados, posteriormente fueron refrigerados inmediatamente.
- f) Se llevaron las semillas a la estufa por 72 horas para asegurar su correcto secado y luego se midió el rendimiento a través de la ecuación N°3.
- g) Se seleccionó el tiempo de residencia y la temperatura de operación que reportó el mayor valor de rendimiento del extracto obtenido.

3.5. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Para la determinación de la actividad enzimática se empleó un método que comprobó la existencia de la enzima papaína y su efectividad.

3.5.1. Método de coagulación de la leche (Balls and Hoover).

Este método se basa en la capacidad de la papaína para coagular la leche, ya que esta puede hidrolizar el enlace peptídico de la caseína presente en la leche. Para esta prueba de actividad enzimática se prepararon soluciones de papaína utilizando la enzima pura y a su vez las muestras de la papaína extraída que posean mayor rendimiento para cada solvente, siguiendo el procedimiento basado en el Trabajo de (Aguirre & Castillo, 2009) descrito a continuación:

- a) Se pesaron 7,75 gramos de leche en polvo.

b) Posteriormente se midieron 54 mililitros de agua y vertidos en un vaso de precipitados.

c) Se diluyó la leche en el agua y se calentó a 30 °C en baño de maría, manteniendo la temperatura en la estufa.

d) Seguidamente se prepararon soluciones utilizando los extractos obtenidos de papaína y ácido acético de diferentes concentraciones: 0,0025; 0,005; 0,01 y 0,02 litros por mililitro de ácido acético.

e) Después se prepararon 6 muestras de 10 mililitros cada una de leche, agregando diferentes cantidades de solución a cada muestra. (0,5; 1; 2; 4; 6 y 7) mililitros.

f) Se mezcló el contenido y se verificó la formación de coágulos de leche, registrando el tiempo que tomó desde que se agregó la solución de la enzima hasta la formación del coágulo.

e) Una vez realizado el procedimiento con los extractos obtenidos que posean mayor rendimiento para cada solvente, se repitió este procedimiento empleando para la preparación de las soluciones de papaína y ácido acético, una muestra de papaína pura.

3.6. RECUPERACIÓN DEL SOLVENTE POR MEDIO DE DESTILACIÓN AL VACÍO

En busca de recuperar el solvente y secar las muestras, los extractos enviados a espectroscopia de infrarrojo fueron sometidos a una destilación al vacío como se describe a continuación:

a) En un balón de 250 ml se colocó todo el extracto proveniente de las pruebas con mayor rendimiento, éste a su vez se ubicó en un baño térmico que controlaba la temperatura para que esta no excediera los 55°C.

b) Se conectó a un condensador y trabajando a presión de vacío, ya que se utilizó una bomba de vacío, se realizó la destilación hasta lograr una reducción del 80% del volumen original, o al observar que no caían gotas. En las Figuras N°13 y N°14 presentada a continuación se aprecia el montaje para la recuperación del solvente.



Figura N° 13. Montaje utilizado para la recuperación del solvente. (Fuente propia)



Figura N° 14°. Montaje utilizado para la recuperación del solvente. (Fuente propia)

3.7. CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Con el propósito de lograr una correcta identificación del método de extracción de papaína, que permita obtener la mayor cantidad de ésta, los extractos de mayor rendimiento obtenidos en cada uno de los métodos estudiados en este trabajo de grado se caracterizaron mediante la técnica de espectroscopia de infrarrojo (IR), con el equipo ubicado en el Laboratorio de Radiación Magnética Nuclear de la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias de la UCV. En la Figura N°15 se observa el Equipo de Espectroscopia de Infrarrojo de doble haz empleado.



Figura N° 15. Equipo de Espectroscopia de Infrarrojo de doble haz.

Se analizaron los extractos de papaína que arrojaron el mayor valor de rendimiento por método de extracción, calculado mediante la ecuación N°3. Posteriormente se compararán los resultados de rendimiento obtenidos mediante los métodos de extracción que se utilizaron en este Trabajo de Grado, para luego determinar cuál fue el método más eficiente en la extracción de la papaína contenida en la semilla de la lechosa.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En esta sección se presentan los resultados obtenidos luego de aplicar las diferentes técnicas para extraer la papaína contenida en la semilla de lechosa incluyendo su respectivo análisis y discusión, demostrando así el logro de los objetivos planteados en este Trabajo Especial de Grado.

4.1. EVALUACIÓN PRELIMINAR

Para el desarrollo del presente Trabajo Especial de Grado, la materia vegetal que se utilizó fue la lechosa tipo Cartagena, adquirida en el mismo sitio durante toda la investigación. La fruta empleada para llevar a cabo las extracciones de la papaína se encontraba madura debido a sus características físicas.

4.2. EXTRACCIÓN CON SOXHLET

4.2.1. Influencia de la humedad de la materia vegetal en el rendimiento

Se efectuaron tres (3) pruebas previas con el equipo de extracción tipo Soxhlet, utilizando como solvente agua destilada con el fin de determinar el estado de humedad de las semillas para la extracción de la papaína.

En la siguiente Figura N°16 se muestran las diferentes semillas utilizadas en las pruebas, del lado izquierdo se observan las semillas obtenidas a partir de la fruta recién cortada, en el medio las semillas parcialmente húmedas y del lado derecho se tienen las semillas deshidratadas.



Figura N° 16. Semillas Húmedas, Parcialmente Húmedas y Semilas Deshidratadas

En la Figura N° 16, se ven algunas diferencias entre las semilla y la variación respecto a la humedad que contienen, en donde se puede observar que cuando éstas se encuentran húmedas son de color negro, y a su vez poseen una capa mucilaginosa, es decir, una solución acuosa espesa de goma o dextrina que las recubre, llamada sarcotesta (Fundación del Desarrollo Agropecuario, 1998). Las semillas parcialmente húmedas son marrones oscuras pero conservan cierto brillo y son de textura pegajosa, mientras que cuando están secas son de color marrón oscuro y no poseen brillo en donde a su vez se presento la contracción y el endurecimiento de éstas.

Previo a las extracciones del plan experimental, se determinó la humedad que contienen las semillas de la lechosa, las cuales se introdujeron en la estufa a una temperatura de 55 °C, condición establecida por el equipo empleado. Al obtener dicho valor se calculó el porcentaje de rendimiento en base seca de las extracciones realizadas. A continuación se presenta la Figura N° 17, donde se muestra la variación del porcentaje de humedad contenida en la semilla de la lechosa en función del tiempo de secado en la estufa.

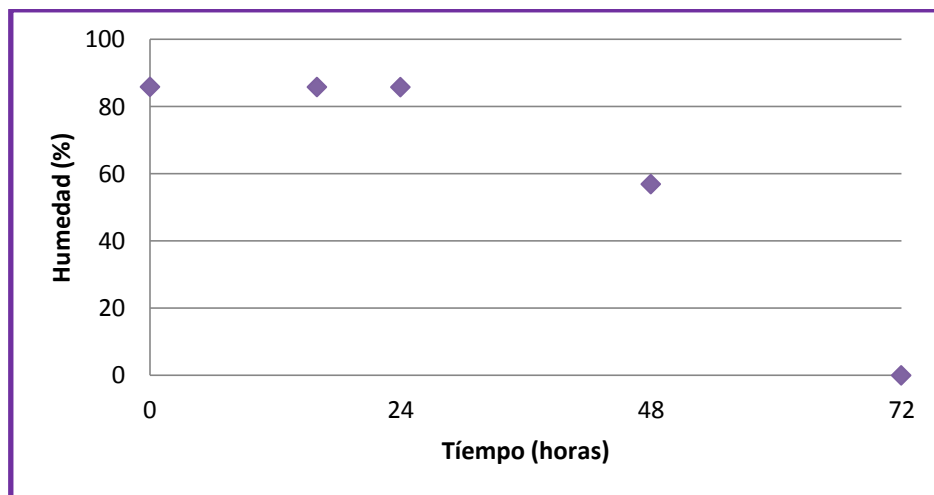


Figura N° 17. Contenido de Humedad presente en la semilla de la Lechosa.

Para el cálculo de la humedad se consideró que la semilla posee cero (0) por ciento de humedad cuando su masa se mantiene constante en el tiempo durante el secado. En la Figura anterior se muestra que mientras transcurre el tiempo de secado, la humedad en la semilla disminuye, obteniéndose un valor de porcentaje de Humedad de la semilla de un 84 ± 1 %, y para el estado parcialmente húmedo se obtuvo un porcentaje de humedad de 57 ± 1 %.

Seguidamente, se presenta la Tabla N° 5 con los resultados generados, basándose en el rendimiento del extracto utilizando agua destilada como solvente.

Tabla N° 5. Rendimiento según la humedad contenida en la semilla.

Estado de Semilla	Rendimiento (R \pm 1%)
Húmedas	13
Parcialmente Húmedas	18
Deshidratada	16

En la Tabla N° 5 se aprecia que el mayor valor de rendimiento lo presentan las semillas parcialmente húmedas utilizando el equipo de extracción tipo Soxhlet. A su vez se puede apreciar que existe una diferencia de 2 % p/p por encima del valor porcentual respecto al estado seco, esta diferencia significativa garantiza que la condición de humedad favorable para la extracción de papaína es la de parcialmente

húmeda. Esto posiblemente se debe a que el agua presente en la materia vegetal con 57% de humedad, actúa como co-solvente en los procesos de extracción, y además, al secar las semillas, se observó la contracción y el endurecimiento de la materia vegetal, lo cual pueda dificultar la extracción de los compuestos de interés, debido a que posiblemente los poros de la materia vegetal se cerraron impidiendo el paso del solvente, lo que contribuye a la disminución de los rendimientos obtenidos. En el caso de las semillas frescas, es posible que la sarcotesta funcione como una especie de escudo, obstaculizando el paso del solvente a la materia vegetal, esta capa se pierde una vez que se produce el secado de las semillas. Estos resultados coinciden con los obtenidos por (Arias & López, 2013) quienes determinaron que para el albedo de naranja cierto contenido de humedad favorecía la extracción.

4.2.2. Caracterización fisicoquímica de los extractos obtenidos durante la extracción de papaína

La caracterización fisicoquímica de los extractos obtenidos se basó en la medición de la diferencia de densidades de las muestras obtenidas con los diferentes solventes empleados, mediante el uso del picnómetro.

En la Tabla N°6, se presenta la composición aproximada de la semilla de la lechosa.

Tabla N° 6. Composición Aproximada de las semillas de la Lechosa. (Marfo, Oke, & Afolabi, 1986)

	Composición Aproximada
Humedad	6,2
Proteína Cruda	28,3
Fibra cruda	22,56
Lípidos	28,41
Cenizas	3,5
Carbohidratos por diferencia	11,03

Se puede observar en la Tabla N°6, que la semilla de la lechosa es una rica fuente de proteínas, lípidos y fibra cruda. Estos valores altos para la composición

aproximada de las semillas, garantizan que éstas son una rica fuente de nutrientes. (Marfo, Oke, & Afolabi, 1986)

En la Tabla N° 7, se presentan las características físicas como la densidad y el color, tanto del solvente puro como del extracto obtenido a través del equipo Soxhlet, utilizando los distintos solventes seleccionados. A continuación, se muestran los valores de densidad obtenidos para cada solvente utilizando la extracción convencional tipo Soxhlet. Se puede observar que la mayor diferencia entre la densidad del solvente puro y el extracto se presentó en las extracciones donde se utilizó etanol y n-hexano, siendo el etanol el que obtuvo una mayor diferencia entre la densidad del solvente y la densidad del extracto. El aumento de densidad promedio de la mezcla puede deberse a que la mayoría de los componentes en el interior de la semilla tienen densidad superior a la de los alcoholes, demostrándose así la extracción de componentes más densos.

Tabla N° 7. Caracterización Físicoquímica de los Solventes Utilizados. (Elaboración propia)

Solvente	Característica del Solvente	Densidad del Solvente (g/ml) $\pm 0,0001$	Características del Extracto	Olor del Extracto	Densidad del Extracto (g/ml) $\pm 0,0001$	Diferencia de densidad (g/ml) $\pm 0,0001$
Agua Destilada	Incoloro, Líquido	1,0000	Líquido Marrón Oscuro	Olor característico a tierra	1,0221	0,0221
Etanol	Incoloro, Líquido	0,7890	Líquido Amarillo	Olor característico de la Lechosa y del solvente	0,8245	0,0355
n-Hexano	Incoloro, Líquido	0,6548	Líquido Amarillo claro	Olor característico de la Lechosa y del solvente	0,6821	0,0273
Acetato de Etilo	Incoloro, Líquido	0,9000	Líquido Amarillo claro	Olor característico de la Lechosa con fuerte olor del solvente	0,9197	0,0197

Seguidamente, se presenta la Figura N° 18 en donde se puede apreciar el conjunto de muestras resultantes de la extracción con el equipo tipo Soxhlet con diferentes solventes.

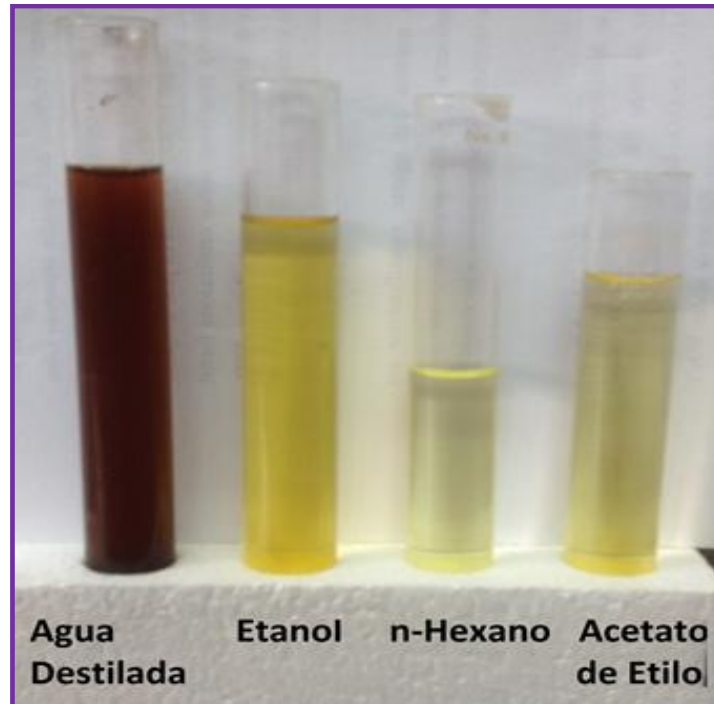


Figura N° 18. Conjunto de Muestras Resultantes de la Extracción con el Equipo Tipo Soxhlet con diferentes solventes. (Elaboración propia)

En la Figura N° 18 presentada anteriormente, se observan que empleando agua destilada como solvente, se obtiene un extracto marrón oscuro, mientras que con etanol, n-Hexano y Acetato de etilo se obtiene un extracto amarillo, el extracto con etanol es amarillo oscuro, el de acetato de etilo es claro, por otro lado con el n-Hexano se obtuvo un extracto aún más claro.

A su vez es importante destacar que las semillas luego del proceso de extracción presentaban diferencias de color, es por ello que posteriormente se tiene la Figura N°20 en donde se observa el conjunto de semillas resultantes de la extracción con el equipo tipo Soxhlet utilizando distintos solventes.

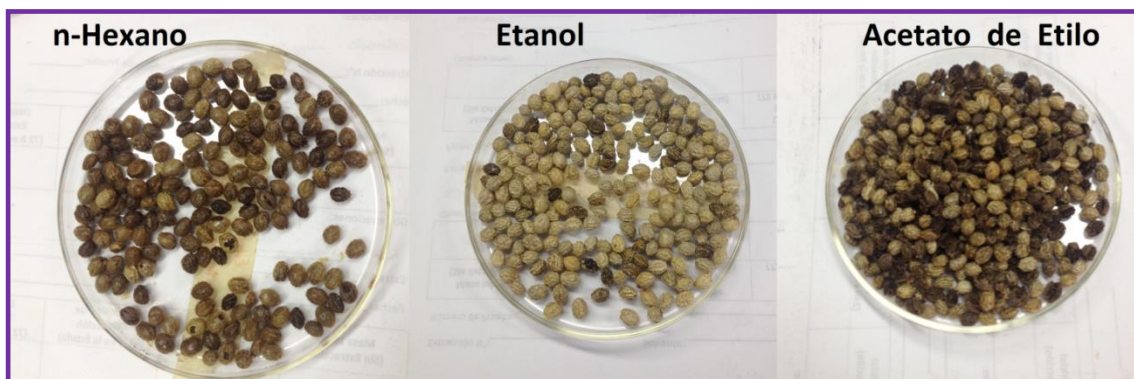


Figura N° 19. Conjunto de Semillas Resultantes de la Extracción con el Equipo Tipo Soxhlet con diferentes solventes. (Elaboración propia)

En la Figura N° 19 se observan las características físicas de un conjunto de semillas posterior a la extracción con el equipo Soxhlet. Las mismas presentan distintas tonalidades de color, utilizando n-hexano como solvente se obtienen unas semillas de color verde como también marrones. Utilizando etanol como solvente estas en su mayoría son de color blancas con la presencia mínima de algunas marrones, por otra parte las semillas utilizando acetato de etilo se observan que son de color blanco y marrón.

4.2.3. Rendimiento por solvente

El análisis de rendimiento se fundamentó en la diferencia de masa entre el estado previo a la extracción y el estado luego de haberse realizado la misma, incluyendo la eliminación del solvente que pueda quedar en la materia vegetal.

Empleando la técnica de extracción por arrastre con vapor, usando el equipo tipo Soxhlet, se llevó a cabo el primer análisis de rendimiento donde se seleccionó el mejor solvente según el mayor valor de rendimiento obtenido. Se corroboró estos resultados con los espectros infrarrojos de los extractos obtenidos, según el solvente utilizado y con la prueba de coagulación de la leche, garantizando así la presencia de papaína, ya que durante la extracción se pueden obtener otros componentes presente en la matriz vegetal. A continuación, se presenta la Tabla N° 8 con los solventes empleados y sus respectivos valores de rendimiento.

Tabla N° 8. Valores de Rendimiento de los Solventes Utilizados en el Equipo Tipo Soxhlet.

Solvente Empleado	Rendimiento (R ± 1%)
Etanol	53
Hexano	44
Agua Destilada	18
Acetato de Etilo	15

En la Tabla N° 8 mostrada anteriormente se expone, que el mayor rendimiento se obtuvo empleando etanol como solvente, el cual es un solvente polar en donde la papaína es altamente soluble, el segundo mejor rendimiento se obtuvo al utilizar n-Hexano con una diferencia de 9 % p/p aproximadamente con respecto al etanol, como se mencionó anteriormente; de igual forma se sabe que la papaína es insoluble en agua y en la mayoría de los solventes orgánicos.

Es importante tener en cuenta al momento de realizar la extracción de la materia vegetal de interés que, el solvente elegido debe ser selectivo y con baja viscosidad, generalmente se usa solvente en estado puro y conforme transcurre la extracción la concentración del soluto incrementa y el gradiente de concentración disminuye, aumentando así la viscosidad del líquido. Para la selección del solvente se recomienda que sea eficaz y económico, generando mayores rendimientos a un bajo costo. (Ullauri, 2010).

La extracción con solventes no destruye las sustancias, simplemente separa concentrándolas en su seno, para su posterior refinación con otros procedimientos y técnicas. Generalmente, los principios activos de las plantas son extraídos principalmente con etanol. (Ullauri, 2010).

Si bien el rendimiento del etanol comercial fue el que obtuvo un mayor valor, es necesario corroborar el rendimiento con los espectros obtenidos de cada uno de los extractos con el fin de verificar la presencia del componente de interés de la papaína tomando como referencia la estructura de la papaína presentada en la Figura N° 3 (Capítulo II).

4.2.4. Caracterización por Espectroscopia de Infrarrojo (IR) de los extractos obtenidos según el solvente empleado

En la Figura N° 20 se presentan los espectros infrarrojos de los extractos obtenidos, así como el espectro de la papaína comercial.

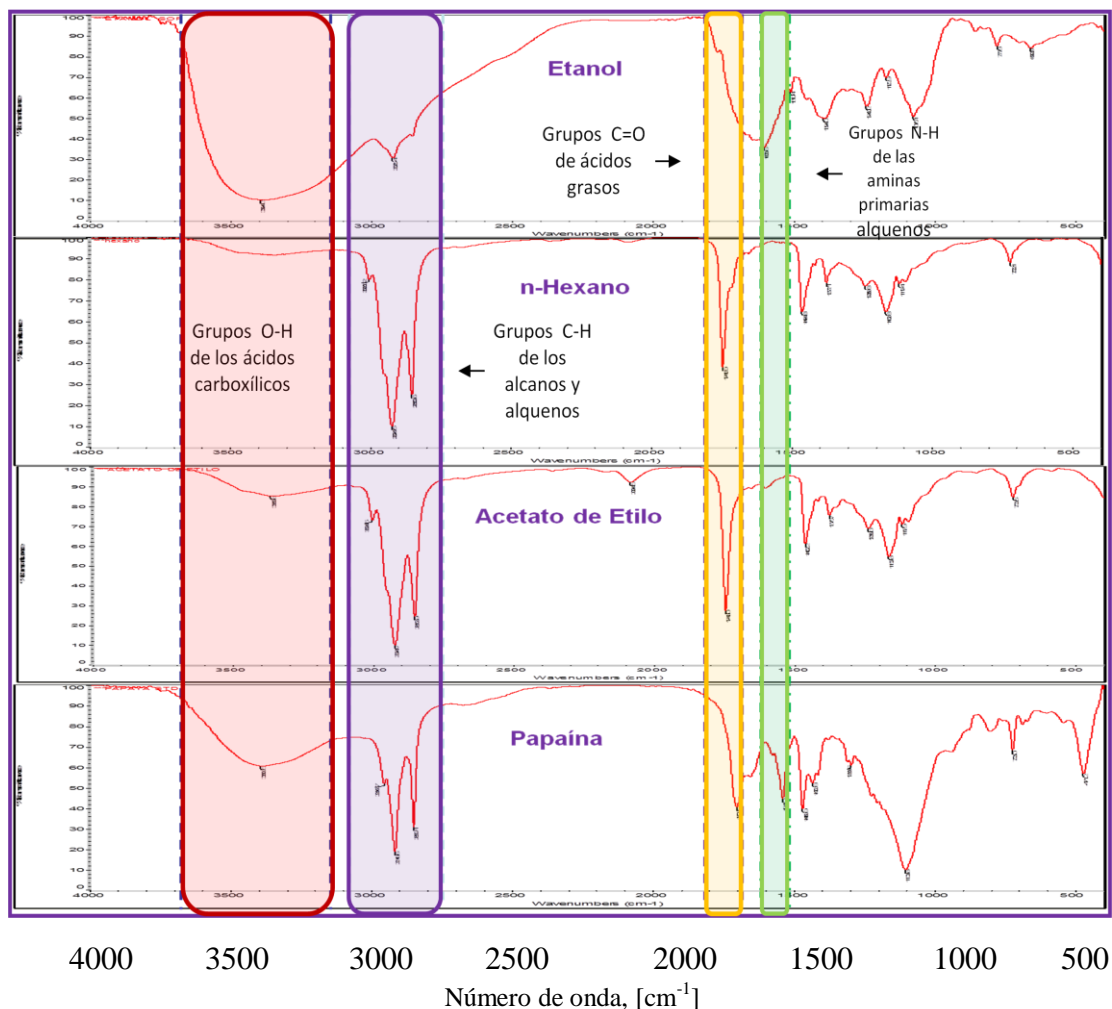


Figura N° 20. Espectros infrarrojos de los extractos obtenidos utilizando etanol, n-hexano y acetato de etilo como solvente de extracción aplicando el equipo Soxhlet comparados con el espectro infrarrojo de la papaína comercial

En la Figura N° 20 destacan los picos en las bandas de frecuencias de los compuestos característicos de la enzima, como lo son, el enlace $-OH$ del ácido carboxílico y $-N-H$ de las aminas, por lo tanto el solvente que presente picos más pronunciados para estos enlaces se considera como el solvente más adecuado para la

extracción de papaína. Es necesario señalar que durante la elaboración de estas figuras se eliminaron los espectros de los compuestos químicos de los solventes empleados en la extracción utilizando el software “OMNIC spectral analyst” con el fin de presentar únicamente el espectro de los componentes extraídos.

Se puede apreciar que no todos los espectros presentan el mismo comportamiento. La presencia de señales alrededor de 3000 cm^{-1} corresponden a los alcanos y alquenos (C-H) posiblemente correspondientes a la estructura de los residuos aminoácidos o ácidos grasos, característicos de la estructura de la papaína exhibida en la Figura N°3 (Capítulo II). Los solventes que presentaron una absorción más intensa de los enlaces C-H fueron el n-hexano y el acetato de etilo, este comportamiento es lógico ya que los compuestos no polares son solubles en solventes de similar característica. Alrededor de 1740 cm^{-1} se puede apreciar señales de absorción del enlace C=O de los ácidos grasos para todos los espectros exceptuando el etanol.

A su vez se observa que la banda de $1650\text{-}1580\text{ cm}^{-1}$ correspondiente posiblemente a las aminas primarias, que son compuestos altamente polar y característicos de la estructura de la papaína, sólo se pueden apreciar en el espectro obtenido utilizando etanol como solvente, ya que éste posee afinidad para extraer compuestos polares.

En la banda 3391 cm^{-1} se encuentran los grupos hidroxilo (-OH), característico del ácido carboxílico, que se encuentran en la estructura química de la papaína. El oxígeno tiene una electronegatividad de 3,5 y el hidrógeno de 2,1. (Durst & Gokel, 1985). Esta gran diferencia de electronegatividad origina la polarización del enlace, por lo tanto se encuentra evidente su presencia en el espectro observado empleando etanol como solvente.

Basándose en el rendimiento y coincidiendo con los espectros obtenidos, según el solvente utilizado, el etanol comercial es el solvente con el cual se obtuvo la mejor extracción lo cual puede favorecer la obtención de papaína, debido a la afinidad de la está. Además, el etanol se utiliza tradicionalmente en aquellos casos en

que se precisa la solubilización de sustratos orgánicos e inorgánicos como es el caso de la papaína.

4.3. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS (EAM)

En esta sección se presentan los diversos resultados de rendimiento obtenidos en la evaluación de los parámetros utilizados en la Extracción Asistida por Microondas (EAM).

Los parámetros que afectan a la eficacia de la Extracción Asistida por Microondas son: la potencia y el tiempo de extracción. La cantidad de energía aplicada es un parámetro a controlar, debido a que puede producir un calentamiento excesivo de la muestra. El tiempo de extracción también es estudiado, debido a que valores excesivamente largos podrían causar la degradación de compuestos. La mayoría de estos parámetros pueden optimizarse mediante diseños de experimentos, lo que permite establecer las condiciones óptimas, permitiendo así la obtención del mayor rendimiento en la extracción. (Canosa M., 2009).

4.3.1. Determinación del tiempo máximo de extracción

A continuación, se presenta la tabla de los tiempos de calentamiento promedio obtenidos al someter a calentamiento por microondas al 100% de potencia, varias muestras de etanol junto a las semillas, realizadas para la selección del tiempo máximo de Extracción.Asistida por Microondas de la papaína contenida en la semilla de Lechosa. Seguidamente, se presenta la Tabla N° 9 el barrido de tiempos realizado, a potencia 100%, para la determinación del tiempo máximo de exposición.

Tabla N° 9. Barrido de tiempos, a potencia 100%, para la determinación del tiempo máximo de exposición.

Solvente	Tiempo (seg.)								Observaciones
	0	5	10	15	20	21	22	25	
Etanol	Temperatura (°C)								El burbujeo ocurrió a los 22 seg. A 100 % de potencia
	26	32,3	43	52,7	60,8	61,4	65	68	

En la tabla N° 9 se puede observar que entre 0 y 15 segundos de exposición del solvente a las microondas, el mismo no alcanza su punto de ebullición. A los 20 segundos de exposición a las microondas, aun no se observaron las primeras burbujas en el solvente, pero la temperatura indicaba la proximidad al punto de ebullición. A los 25 segundos, el burbujeo observado era mucho más brusco y difícil de atenuar, es por ello que se realizó un barrido entre los 20 y 25 segundos, para obtener el tiempo en el cual ocurría la aparición de la primera burbuja y evitar que el solvente se evaporara, lo cual no conviene en la extracción, ya que la misma se debe realizar evitando perdidas de masa. Observando que a los 22 segundos ocurrió la primera burbuja, se escogió el tiempo igual a 22 segundos como tiempo máximo de exposición para las extracciones de papaína por microondas que se realizaron en este Trabajo de Grado.

4.3.2. Influencia de la potencia en el rendimiento por EAM

A continuación, en la Figura N° 21 se presentan los valores de rendimiento promedio obtenidos al variar la potencia en la extracción de papaína asistida por microondas.

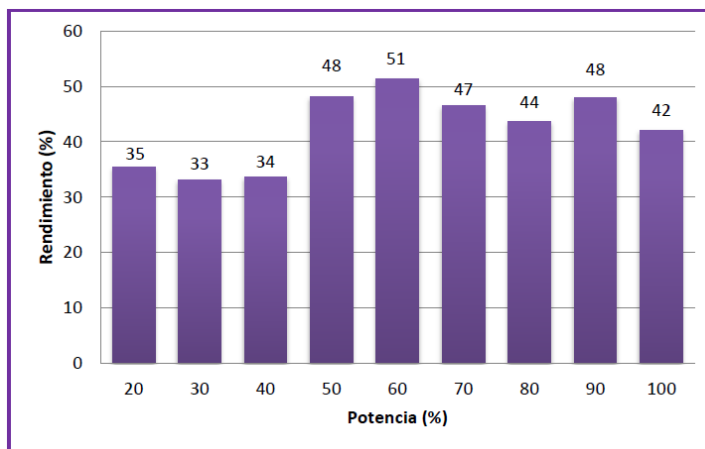


Figura N° 21. Influencia de la potencia en el rendimiento de la extracción de papaína.

En la Figura N° 21 se muestra que el mayor rendimiento se obtuvo utilizando 60% de la potencia total del microondas que es de 1200 Watts, obteniéndose muy poca diferencia con el rendimiento obtenido usando una potencia de 50%, mientras que para potencias menores de 50% se obtienen rendimientos no satisfactorios, pues

se sabe que al aumentar la potencia la temperatura también asciende, favoreciendo las condiciones de la extracción. (AgroWaste, 2013). Por otra parte, trabajar a la máxima potencia o valores cercanos a ésta, tampoco es satisfactorio, ya que es posible que el etanol, compuesto empleado como solvente, alcance su punto de ebullición y se pierda por evaporación, reduciendo la eficiencia de la extracción afectando así el rendimiento y ocasionando una disminución del mismo. Durante la investigación realizada por (Gil & Colaboradores, 2012) no se trabajó con valores cercanos a la potencia máxima del microondas, sino utilizando una potencia de 390W y un tiempo de 90 segundos, mientras que en este Trabajo Especial de Grado se obtuvo un mayor rendimiento con una potencia más alta, equivalente a 720 W, pero utilizando un menor tiempo de exposición.

4.4. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO (EAU)

En esta sección se presentan los distintos resultados de rendimiento obtenidos en la evaluación de los parámetros utilizados en la Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU).

4.4.1. Influencia de la temperatura en la extracción de papaína por EAU

En la Figura N°22 se presentan los valores de rendimiento promedio obtenidos al variar la Temperatura en la extracción de papaína asistida por ultrasonido.

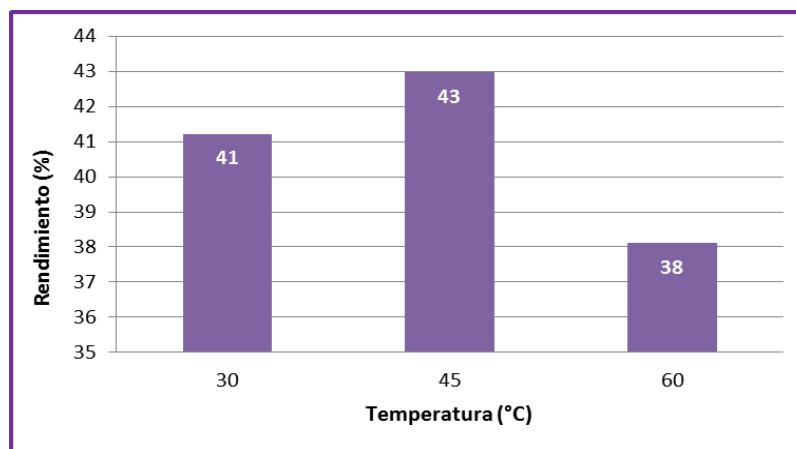


Figura N° 22. Influencia de la temperatura en el rendimiento de EAU.

En la Figura N° 22 se observa que el mayor rendimiento se obtuvo a la temperatura de extracción de 45°C, obteniendo un menor rendimiento para temperaturas de 60°C, con una diferencia de al menos 5 % p/p del rendimiento mayor. Generalmente el uso de altas temperaturas produce mejores rendimientos que cuando se trabaja en extracciones frías. (Morales Bermúdez, 2011)

En la Extracción Asistida por Ultrasonido un aumento en la temperatura de trabajo implica mayor eficiencia en el proceso de extracción gracias al incremento del número de burbujas de cavitación y del área de la superficie de contacto, no obstante este efecto tiende a desaparecer cuando se trabaja a temperaturas próximas a la ebullición. Por otra parte, hay que tener en cuenta que algunos analitos se degradan rápidamente con el aumento de la temperatura y en caso de compuestos orgánicos volátiles con altas presiones de vapor, estos pueden perderse por evaporación (Morales Bermúdez, 2011), es por ello, que el rendimiento puede disminuir debido a un aumento de la temperatura, esto pudo ocurrir durante la extracción provocando una disminución en el rendimiento a temperaturas de 60°C.

En vista que el rendimiento obtenido empleando 30°C como temperatura de operación es muy cercano al obtenido trabajando a 45°C, se tomó como mejor condición de extracción el primer caso, considerando además, que la materia vegetal empleada para las extracciones se ve favorecida a bajas temperaturas para evitar su degradación.

4.4.2. Influencia del tiempo de extracción en los rendimientos por EAU

A continuación, en la Figura N° 23 se presentan los valores de rendimiento promedio obtenidos al variar el tiempo en la extracción de papaína asistida por ultrasonido.

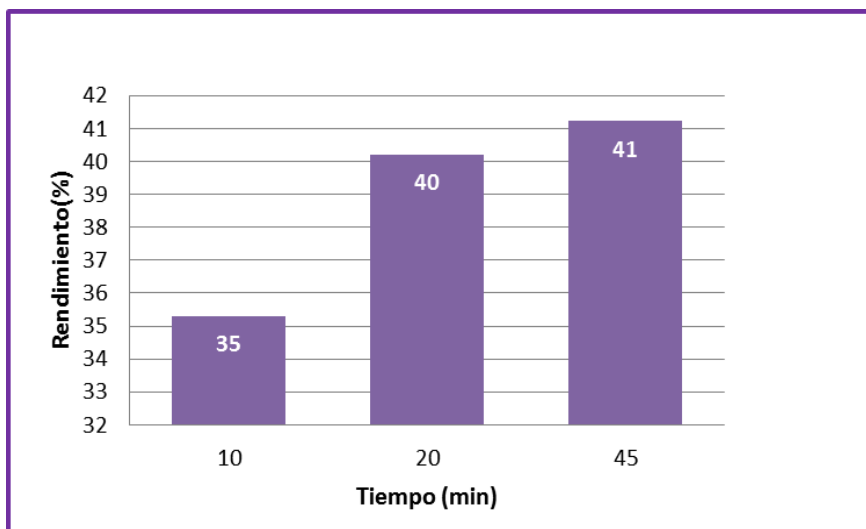


Figura N° 23. Influencia del tiempo en el rendimiento de EAU.

En la Figura N° 23 presentada anteriormente se muestra que realizando la extracción a un mismo valor de temperatura en este caso 30°C, el aumento del tiempo de extracción incrementa la cantidad de papaína extraída de la materia vegetal, contribuyendo a que el rendimiento sea mayor. Esto gracias a la mayor exposición de la materia vegetal a las ondas ultrasónicas. No obstante se debe tener cuidado con los tiempos de exposición prolongados, ya que esto puede ocasionar la degradación de la materia vegetal, estos resultados obtenidos coinciden con la investigación de (Arias & López, 2013), ya que al utilizar la EAU, determinaron que con un aumento en el tiempo de extracción favorecía la misma.

El tiempo que permitió la obtención del mayor valor de rendimiento fue de 45 minutos, a pesar de que la diferencia de rendimientos obtenidos al emplear tiempos de 45 minutos o de 20 minutos no fue considerable, se seleccionó como el mejor tiempo de extracción por ultrasonidos 20 minutos, lo que favorece a la disminución de los costos energéticos ocasionados por el proceso de extracción.

En busca de observar mejor los resultados obtenidos a partir de la variación del tiempo y la temperatura se presenta a continuación la Figura N° 24, donde se muestra los valores de rendimiento promedio obtenidos al variar el tiempo y la temperatura en la extracción de papaína asistida por ultrasonido.

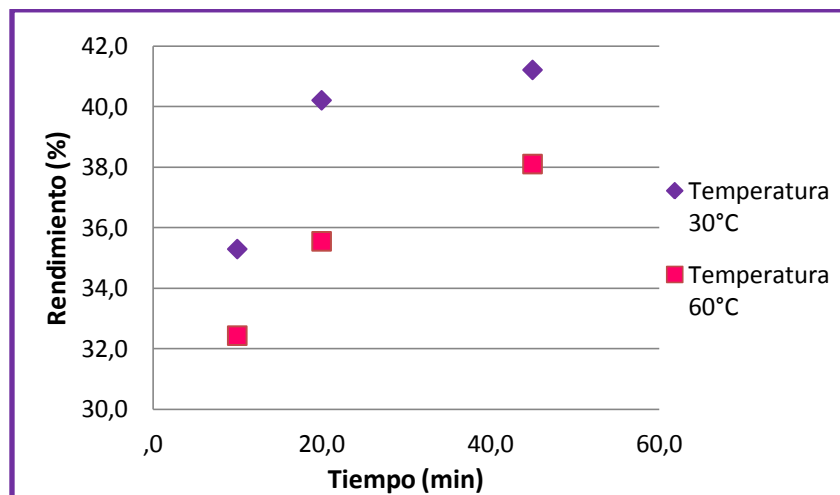


Figura N° 24. Influencia del tiempo y la temperatura en el rendimiento de EAU.

En la Figura N° 24 se pueden observar los valores de rendimiento realizando una variación del tiempo y de la temperatura, siendo el mejor valor para este último parámetro 30°C. Se puede observar que se obtiene una misma tendencia para las dos temperaturas utilizadas, la extracción se ve favorecida a medida que el tiempo de extracción aumenta.

4.5. COMPARACIÓN DE RENDIMIENTOS DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

A continuación, se presenta la Tabla N° 10, en donde se observan los valores de rendimiento promedio que se obtuvieron para cada uno de los métodos de extracción de papaína presente en la semilla de la lechosa, realizados en este Trabajo de Grado.

Tabla N° 10. Rendimientos promedio para los métodos de extracción de la papaína presente en la semilla de la lechosa.

Técnica de Extracción	Rendimiento Promedio (R ±1%)	Tiempo de operación (seg)
Soxhlet	53	86 400
Extracción Asistida por Microondas	51	22
Extracción Asistida por Ultrasonido	41	2 700

En la Tabla N° 10 se observa que el mayor rendimiento se obtuvo utilizando el método de Soxhlet, y con sólo una diferencia de 2% se tiene el rendimiento promedio obtenido por el método de Extracción Asistida por Microondas; finalmente, el menor rendimiento obtenido fue el de la Extracción Asistida por Ultrasonido. Estas diferencias pueden deberse a que en la técnica por arrastre con vapor el tiempo de contacto que dispone la matriz vegetal con el solvente puro es mayor, ya que se garantiza un delta de concentración en repetidas ocasiones durante veinticuatro (24) horas. Además, como se mencionó anteriormente, la técnica tradicional usando el equipo de Soxhlet, es la empleada como referencia para validar otras técnicas utilizadas en la actualidad. (Canosa M. d., 2009).

Para la extracción de papaína de la semilla de la lechosa se obtuvo un mayor rendimiento empleando la técnica de Extracción Asistida por Microondas en comparación a la Extracción Asistida por Ultrasonido, esto puede deberse a que la EAM permite el control de más variables que afectan la extracción, como el tiempo y la potencia, mientras que en el equipo empleado para la EAU sólo es posible controlar la temperatura y el tiempo, en rangos preestablecidos por el equipo, no por el usuario.

Finalmente, basándose en el rendimiento obtenido, se puede considerar la extracción convencional tipo Soxhlet la más efectiva para la extracción, lo cual beneficia a la obtención de papaína. Sin embargo, la diferencia de tiempo de operación hace más eficiente la Extracción Asistida por Microondas, que solo difiere en 2% al rendimiento obtenido por el Soxhlet. A su vez se realizó la espectroscopia de infrarrojo en busca de corroborar la presencia de los grupos funcionales presentes en la estructura química de la enzima.

4.6. CARACTERIZACIÓN POR ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO (IR) DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS SEGÚN EL MÉTODO DE EXTRACCIÓN EMPLEADO

En esta sección se presentan los espectros de IR de los extractos obtenidos por las diversas metodologías de extracción empleadas en el presente Trabajo Especial de

Grado, con el fin de observar la presencia de papaína en dichos extractos. A continuación, se aprecian los Espectros de Infrarrojo de los extractos obtenidos según el método de extracción empleado.

Se considera que el método de extracción más eficaz para la obtención de papaína es aquel que presenta en los espectros de infrarrojos picos más pronunciados en los grupos funcionales claves que conforman la papaína, cuyo espectro se muestra en la Figura N° 25 para realizar la comparación.

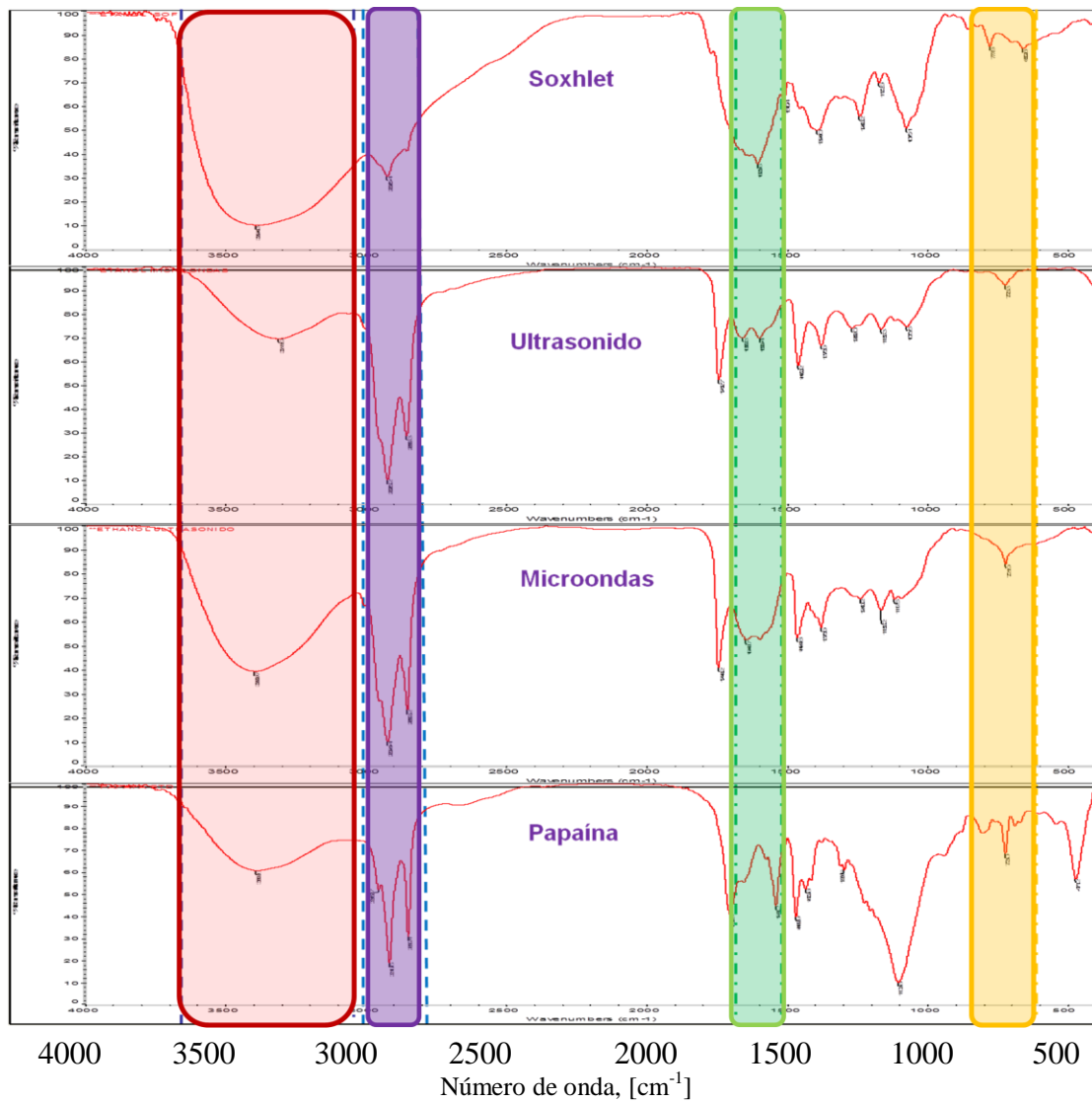


Figura N° 25. Espectros de Infrarrojo de los extractos de la semilla de la Lechosa según el método de extracción empleado.

En la Figura N° 25 se tienen los espectros obtenidos según el método de extracción empleado, utilizando etanol como solvente. Los espectros reflejan la posible presencia de enlaces –OH correspondientes a los ácidos carboxílicos, compuesto que posee alta polaridad, reflejados en la banda de frecuencia de 3360 cm^{-1} en el sector de estiramiento, para la técnica del soxhlet, y se observa en la banda delineada de color morado. La frecuencia de 1605 cm^{-1} en donde posiblemente se ubique el espectro de aminas primarias, resaltada de color verde, también presentes en el espectro del soxhlet. Tanto el ácido carboxílico como las aminas primarias son compuestos claves que conforman la estructura de la papaína.

Para el espectro empleando la EAM se observa la existencia del grupo –OH (banda morada) de los ácidos carboxílicos, en la frecuencia de 3399 cm^{-1} , sin embargo, este pico no posee la misma intensidad o fuerza que el del extracto adquirido por soxhlet. Del mismo modo, la intensidad del pico característico de las aminas primarias, que se puede observar en la frecuencia 1644 cm^{-1} , es menor para el extracto obtenido empleando la extracción asistida por microondas, en comparación al extracto del soxhlet, lo que puede indicar que con el método convencional tipo soxhlet se obtiene la mejor extracción lo cual puede favorecer en la obtención de papaína.

En el espectro obtenido del extracto de la EAU se observa el enlace –OH en la frecuencia de 3311 cm^{-1} y las aminas primarias se presentan a una frecuencia de 1658 cm^{-1} . Sin embargo, la fuerza de estos picos es menor a los picos obtenidos con las dos técnicas anteriores, indicando menor presencia de los compuestos característicos de la papaína en el extracto obtenido empleando el equipo de ultrasonido.

Las bandas de color azul señalan la frecuencia en donde se encuentran los compuestos alcanos y alquenos, enlaces que también están presentes en la estructura de la papaína. La banda resaltada de color amarillo confirma la presencia de aminas primarias en los extractos obtenidos, ya que se trata de la región de absorción en donde se muestran los movimientos de flexión del enlace N-H.

Finalmente, a pesar que con el método convencional tipo Soxhlet se obtiene el mayor valor de rendimiento no se puede establecer la mejor calidad del extracto, es por ello que se realiza la prueba de coagulación de la leche, en busca de garantizar la presencia mínima de papaína en los extractos. Basándose en los espectros observados en la Figura N° 25 se puede considerar cualitativamente la Extracción Asistida por Microondas como el método más eficiente de extracción, favoreciendo así la presencia de papaína en los extractos obtenidos de la semilla de la lechosa gracias a sus cortos tiempos de operación.

4.7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

En esta sección se presentan los resultados obtenidos en la determinación de la actividad enzimática en donde se empleó un método que comprueba la existencia de la enzima papaína conocido como el Método de la Coagulación de la Leche (Balls and Hoover), el cual se basa en la capacidad que tiene la papaína para coagular la leche, ya que ésta puede hidrolizar el enlace peptídico de la caseína.

Debido a que este método se trata de una evaluación cualitativa, se muestran a continuación las imágenes donde se observan los coágulos formados en la leche por la acción de la papaína. A su vez se muestra la Tabla N°11 en donde se presentan las observaciones realizadas durante la prueba de coagulación de la leche.

Tabla N° 11. Método de Coagulación de la Leche según el solvente empleado.

Muestra	Observaciones
Papaína comercial	Coagulación inmediata. Solidificación total de la muestra de leche.
Extracto de etanol	Coagulación a los 30 segundos. Solidificación parcial de la muestra de leche.
Extracto de n-hexano	Formación de cavitaciones o burbujas en la muestra líquida de leche. Grumos no diferenciados.
Extracto de acetato de etilo	Coagulación a los 60 segundos. Pocos grumos diferenciados en la muestra de leche.



Figura N° 26. Formación de coágulos en la leche por la acción de papaína comercial.



Figura N° 27. Formación de coágulos de leche por la acción de la papaína extraída de la semilla de lechosa, según el solvente empleado.

En la Figura N° 26 y la Figura N° 27, mostradas anteriormente se presentan los resultados obtenidos al realizar el método Balls and Hoover. En la Figura N° 26 se utilizó la papaína comercial y en la Figura N° 27 se utilizaron los extractos obtenidos con el equipo tipo Soxhlet en donde se utilizaron como solventes: Acetato de etilo, n-Hexano y Etanol; apreciándose la formación de lo que comúnmente se llama coágulo.

Es importante destacar que existe una notable diferencia entre la cantidad de coágulos formados y el tiempo de formación de éstos en las cuatro (4) muestras expuestas en las Figura N° 26 y N° 27 lo cual puede estar asociado a la cantidad de papaína presente en cada una de ellas. La formación de coágulos empleando papaína comercial, como se observa en la Figura N° 26, fue casi inmediata al añadir la

solución de papaína en la leche. Por otro lado, la formación de coágulos empleando el extracto obtenido usando etanol como solvente fue en un tiempo considerablemente rápido, en comparación a las pruebas realizadas con los extractos obtenidos con n-hexano y acetato de etilo en los cuales no se distinguen visiblemente la solidificación del líquido.

En las pruebas realizadas empleando los extractos obtenidos con n-hexano no fue clara la formación de coágulos en la leche, en su lugar se aprecian la formación de burbujas o cavitaciones en el líquido, como se observa en la Figura N° 27, mientras que las pruebas realizadas con los extractos obtenidos con acetato de etilo se observa una pequeña formación de grumos, pero considerablemente menor en comparación a la papaína comercial y el extracto obtenido con etanol.

LOGROS DE LA INVESTIGACIÓN

Aunque la lechosa es una de las frutas más consumidas a nivel mundial, suele ser habitual que al momento de retirar su piel, picarla y comerla, se deseché a la basura un verdadero “tesoro” para la salud: sus semillas. Ellas contienen una enzima cuyas propiedades son insustituibles, como bien señaló el científico venezolano Vicente Marcano, quien descubrió la papaína de la lechosa y sus numerosos beneficios. Este trabajo de investigación confirmó la presencia de los compuestos químicos que conforman la papaína en la semilla de la lechosa gracias a la caracterización por espectroscopía de infrarrojo, demostrando que todas las partes de la fruta, sin importar su estado de maduración pueden ser aprovechadas comercialmente.

Con esta investigación se logró la evaluación del método de extracción convencional por arrastre de vapor y los métodos no convencionales de extracción asistida por microondas y extracción asistida por ultrasonido para la obtención de papaína, abriendo una oportunidad para la investigación de nuevas técnicas producción de esta enzima no estudiadas, además de introducir una nueva alternativa para el aprovechamiento de residuos o desechos de la industria agrícola, farmaceuta,

alimenticia, entre otras. Se demostró que la extracción de la papaína contenida en la semilla de la lechosa, a través de la EAM puede ser una alternativa viable, garantizando tiempos más cortos de operación que se traducen en beneficios económicos para las industrias productoras y consumidoras de esta importante e irremplazable enzima.

CONCLUSIONES

En base a los objetivos planteados en el presente trabajo especial de grado, se presentan a continuación las conclusiones más resaltantes de la extracción de papaína presente en las semillas de la lechosa.

- ✓ La semilla de la lechosa posee una humedad de 84 % p/p.
- ✓ Al usar semillas parcialmente húmedas (humedad de 57%) se obtiene un mayor rendimiento en comparación a semillas húmedas o totalmente deshidratadas.
- ✓ El solvente más eficiente en base al rendimiento para extraer la papaína presente en la semilla de la lechosa es el etanol comercial.
- ✓ En la Extracción Asistida por Microondas, empleando el 100 % de potencia y etanol como solvente, se obtuvo que el tiempo máximo de exposición fue de 22 segundos.
- ✓ La potencia con la cual se obtuvo el mejor rendimiento fue 60 %. (EAM)
- ✓ La temperatura que permitió obtener el mejor rendimiento empleando el método de ultrasonido fue 30 °C.
- ✓ El tiempo más eficiente para el empleo del método de Extracción Asistida por Ultrasonidos para disminuir los costos energéticos del proceso de extracción es de 20 minutos.
- ✓ La técnica de extracción que presentó mayor rendimiento fue la extracción por arrastre con vapor utilizando el equipo tipo Soxhlet, empleando etanol como solvente, con un valor de 53 % p/p.
- ✓ El método de extracción más eficiente para la obtención de papaína presente en la semilla de la lechosa es la Extracción Asistida por Microondas (EAM).
- ✓ Se verificó la formación de coágulos en la leche utilizando el Método de Balls and Hoover, confirmando así la presencia de Papaína en los extractos obtenidos.

- ✓ Se obtuvo un tiempo menor en la coagulación de la leche utilizando el extracto empleando etanol como solvente.
- ✓ Mediante la caracterización de los extractos por la técnica de Espectroscopía de Infrarrojos (IR), se pudo confirmar la presencia de papaína, lo que indica que por los métodos de extracción utilizados se logró obtener la enzima.

RECOMENDACIONES

En base a las conclusiones del presente trabajo especial de grado, se presentan a continuación las recomendaciones sugeridas, con la finalidad de mejorar las futuras investigaciones que precedan a este Trabajo de Grado, en cuanto a lo referente a extracción de papaína.

- ✓ Efectuar un estudio más específico de la condición de humedad, utilizando tiempos más cortos de secado con el fin de obtener el porcentaje de humedad óptimo en busca de obtener un rendimiento mayor.
- ✓ Realizar un estudio en el cual se reduzca el tamaño de la semilla, para determinar su influencia sobre los procesos de extracción estudiados.
- ✓ Trabajar con diferentes tiempos de extracción utilizando la mejor potencia en la Extracción Asistida por Microondas que permita la determinación del tiempo óptimo de operación en donde el rendimiento es mayor.
- ✓ Analizar las muestras generadas aplicando la técnica analítica de Espectroscopia de Masas para conocer la composición de los compuestos extraídos mediante los métodos de extracción utilizados en el presente trabajo.

REFERENCIAS

- AgroWaste. (2013). *Extracción de Compuestos de Interés*. Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación, España.
- Aguirre, E., & Castillo, P. (2009). *Extracción y estudio comparativo de las enzima proteolíticas del fruto Toronche (Carica- Stipulata y de la Papaya (Carica- Papaya) y su aplicación en la industria alimenticia*. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil.
- Arias, D., & López, A. (2013). *Comparación de los métodos de extracción de la pectina contenida en el albedo de la naranja (citrus sinensis L.)*. Universidad Central de Venezuela, Caracas.
- Arias, D., & López, A. (2013). *Comparación de los métodos de extracción de la pectina contenida en el albedo de la naranja (Citrus Sinensis L.)*. Universidad Central de Venezuela, Caracas.
- Badui, S. (2006). *Química de los Alimentos* (Cuarta Edición ed.). Naucalpan de Juárez, México: Pearson.
- Bailey, P., & Bailey, C. (1998). *Química orgánica: conceptos y aplicaciones*. México: Prentice Hall.
- Balls, A., Lineweaver, H., & Thompson, R. (1937). *Isolation and properties of cristalin papain. .*
- BERGHOF. (2012). Recuperado el 24 de ENERO de 2015, de https://www.google.co.ve/search?q=traductor&oq=traductor&aqs=chrome..69i57j69i60l3j69i61j69i59.1753j0j7&sourceid=chrome&es_sm=93&ie=UTF-8
- Binti, N. (2010). *The Extraction of Papain from Papaya Leaves*. University Malaysia Pahang, Malaysia.

- Canosa, M. d. (2009). *Desarrollo de metodología analítica para determinación de Triclosán y Parabenos. Aplicación al estudio de su distribución y transformación en muestras ambientales*. Santiago de Compostela.
- Canosa, M. (2009). *Desarrollo de metodología analítica para determinación de Triclosán y Parabenos. Aplicación al estudio de su distribución y transformación de muestras ambientales*. Universidad Santiago de Compostela, Santiago de Compostela.
- Carballido, M. (2008). *Síntesis asistida por microondas de compuestos de interés biológico e industrial: haloarenos, fulvenos, tricloropirrolidonas, azoles y flavonoides. Modelado de espectros de absorción electrónica de flavonoides*. Universidad Santiago de Compostela, Santiago de Compostela.
- Chemat, F., & Strube, J. (2015). *Green Extraction of natural Products*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Costa, J., & Col. (1991). *Curso de Ingeniería Química. Introducción a los procesos, las operaciones unitarias y los fenómenos de transporte*. Barcelona: Reverté.
- Costa, J., Cervera, S., & col. (1984). *Curso de Ingeniería Química. Introducción a los procesos, las operaciones unitarias y los fenómenos de transporte*. Barcelona: Reverté S.A.
- Cuevas, A. (2003). *Química I*. Ciudad de México: Ediciones Umbral.
- Drenth, J., Jansonius, J., Koekoek, R., & Wolthers, B. (1971). *The structure of papain*. *Adv. Protein Chem.*
- Durst, D., & Gokel, G. (1985). *Química Orgánica Experimental*. Barcelona: Reverté.
- ElKhorri, S., Pare, J., Bélanger, J., & Pérez, E. (2007). The microwave-assisted process (MAPTM1): Extraction and determination of fat from cocoa powder and cocoa nibs. *Journal of Food Engineering* 79 , 79, 1110-1114.

- Febres, L., & Guerra, D. (2013). *Evaluación de relación semillas/solvente en la extracción de papaína presente en la semilla de la lechosa "Carica Papaya L."*. Universidad Central de Venezuela, Caracas.
- Fernández, J. (2005). *Plan de negocio para la producción de papaína en la séptima región*. Universidad de Talca, Curicó.
- Ferrer, J., Gutiérrez, G., & Velásquez, V. (2009). *Determinación del efecto de la maduración de la lechosa (Carica Papaya L.) sobre la concentración de la papaína*. Universidad Rafael Urdaneta, Maracaibo.
- Fosado, R. (2011). *Mecanismo Molecular de la desnaturalización ácida de la Papaína*. Iztapalapa.
- Fundación del Desarrollo Agropecuario. (1998). *Cultivo de Lechosa* (Segunda Edición ed.). Santo Domingo, República Dominicana: FDA.
- Gao, M., & Liu, c. (2005). Comparison techniques for the extraction of flavonoides from cultures cells of *Saussurea medusa Maxim.* *World Journal Microbiology and Biotechnology* , 21, 1461-1463.
- Gil, M., & Colaboradores. (2012). Papaína extraída a partir de la cáscara de la papayuela perteneciente a la especie (*Carica papaya L.*), por medio de microondas con aplicación en el ablandamiento de la carne bovina. *Journal of Engineering and Technology* , 1 (1).
- Glibota, G., Garro, O., & Judis, M. (2000). *Actividad proteolítica de restos del fruto de Carica papaya*. Universidad Nacional del Nordeste, Chaco.
- Guerra, P., & Quijano, M. F. (2012). *Extracción, Caracterización y Comparación de Látex Obtenido, en Secado por Aspersión, de tres Variedades de Papaya (Carica papaya L.)*. Trabajo de Grado, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil.

- Gutiérrez, G., & Velásquez, V. (2009). *Determinación del Efecto de la Maduración de la Lechosa (Carica Papaya L.) Sobre la Concentración de Papaína*. Universidad Rafael Urdaneta, Maracaibo.
- Incropera, F., & DeWitt, D. (1999). *Fundamentos de Transferencia de Calor*. México D.F.: Prentice Hall.
- Jurnak, F., & Mcpherson, A. (1987). *Biological Macromolecules and assemblies Active Sites of Enzymes v. 3* (Vol. 3). Cambridge: John Wiley & Sons Inc.
- King, J. (1980). *Procesos de Separación*. Barcelona: Reverté S.A. .
- Koolman, J., & Rohm, K. (2004). *Bioquímica*. Madrid: Editorial Panamericana.
- Lamarque, A., & col. (2008). *Fundamentos teorico-practicos de Química Orgánica*. Ciudad de Córdoba: Editorial Brujas.
- Landaeta, F., & Orta, L. (2010). *Extracción de la pectina de la semilla del mango (Mangifera Indica L.)*. Universidad Central de Venezuela, Caracas.
- Landaeta, F., & Orta, L. (2010). *Extracción de la pectina de la semilla del mango (manguifera indica L)*. Universidad Central de Venezuela. Caracas: Trabajo especial de grado.
- Lugo, Z., & Fuguet, R. (2004). *Antracnosis en frutos de lechosa (Carica Papaya L.) del tipo Maradol causado por Collectrichum gloeosporioides Perts en el estado Falcón*. Maracaibo.
- Mandal, V., Mohan, Y., & Hemalatha, S. (2007). Microwave Assisted Extraction-An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research. *Pharmacognosy Research Laboratory , 1*.
- Marfo, E., Oke, O., & Afolabi, O. (1986). Chemical Composition of papaya (Carica Papaya) seeds. En *Food Chemistry* (págs. 259-266). Nigeria.
- Martínez, E. (2010). *Química II*. Ciudad de México: Cengage Learning Editores.

- Mason, T. (1999). Sonochemistry: current use and future prospects in the chemical and processing industries. *Philosophical Transactions of the Royal Society a: Mathematical Physical and Engineering Sciences* , 357 (1751), 355-369.
- Morales Bermúdez, M. F. (2011). *Determinación de Hidrocarburos en muestra de agua por extracción Líquido-Líquido asistida por ultrasonido*. Alicante: Universidad de Alicante.
- Morrison, R., & Boyd, .. (1998). *Química Orgánica*. México: Pearson Educación.
- Mulet, A., Benedito, J., Bon, J., & San Juan, N. (1999). Revisión: Ultrasonidos de baja intensidad en tecnología de alimentos. *Food Science and Technology Internacional* , 5 (4), 285-297.
- Palma, M., & Barroso, C. (2001). Ultrasound assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products. *Analytica chimica* (458), 119-130.
- Perry, F., & Hegeman, A. (2007). *Enzymatic Reaction Mechanisms*. New York: Oxford University Press.
- SISIB. (2010). *Biblioteca Digital de la Universidad de Chile*. Recuperado el 23 de Mayo de 2015, de http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/schmidth02/parte08/08.html
- Skoog, D., West, D., & Holler, F. (1997). *Fundamentos de química analítica*. Barcelona: Reverté.
- Ullauri, P. (2010). Transporte de Masa en Extracciones Fase Sólido-Líquido. *Recitela* .
- Villacrés, C. (2001). *Obtención de un hidrolizado enzimático de alta funcionalidad a partir del chocho (Lupinus mutabilis Sweet)*. Quito: Escuela Politécnica Nacional.

- Villavicencio, M. (2011). *Extracción, Concentración y Cuantificación de la actividad enzimática de la Papaína a partir de la Papaya (Carica Papaya L.)*. Abato.
- Welty, J., Wicks, C., & Wilson, R. (1998). *Fundamentos de Transferencia de Momento, Calor y Masa*. Ciudad de México: Limusa S.A.
- Zhuoyan, H. (2010). *Microwave Assisted Extraction: the Effects, Mechanisms and Applicatios on Selected Plant Materials*. Tesis doctoral, The Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong.