

Extracción, purificación y cuantificación de bromelina a partir de cáscara de piña, *Ananas comosus*, para la formulación de un producto dermatológico contra la dermoabrasión

O. Ortigoza-Rodríguez, G. Hernández-Tapia, D. Pérez-Angulo, N. Franco-Jiménez, B. Cantú-Gamboa
Ingeniería en Biotecnología, Área de Concentración de Biología Molecular, Escuela de Ingeniería y Ciencias del Tecnológico de Monterrey Campus Guadalajara. Dra. María José Rivas Arreola. mjriv@tec.mx

RESUMEN: La piña es una fruta tropical de la familia de las bromeliaceae rica en vitaminas A, B, C y tiene actividad proteolítica debida a la bromelina que se activa por la cisteína, tiosulfato y glutatión. La bromelina es una glicoproteína con que actúa sobre los aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas, lo que le da un potencial uso como un compuesto activo en un tratamiento cosmético de dermoabrasión. Para ello, se realizó una extracción de bromelina a partir de residuos de cáscara de piña, licuando los residuos con buffer de fosfato de sodio monobásico. Posteriormente se obtiene el extracto claro, resultante de una centrifugación, el cual se mezcla con acetona (80% p/v) para inducir la precipitación de proteínas; cabe mencionar que esta etapa se realizó con acetona a distintos grados de pureza, siendo la acetona comercial la que muestra un mejor rendimiento con alta actividad enzimática. Finalmente, se eliminó la acetona y se resuspende la bromelina en agua destilada para formar una emulsión con los compuestos oleosos para la formulación de un preparado semisólido para tratamiento terapéutico tópico.

Palabras clave: Bromelina, proteolítica, purificación.

ABSTRACT

Pineapple is a tropical fruit from the bromeliaceae family, rich in vitamins A, B, C and a proteolytic enzyme called bromelain, which is activated by cysteine, thiosulfate and glutathione. Bromelain is a glycoprotein that acts on the basic and aromatic amino acids of proteins, this gives it a potential use as an active compound for a cosmetic product. Bromelain can be extracted from pineapple residues, like the peel, core or stem. In this protocol, bromelain was mechanically extracted from the peel of *Ananas comosus* pineapple, generating a clear extract, subsequently, it is mixed with acetone (80% v/v) to induce the precipitation of bromelain. For purification, three acetone types were tested, a high purity one (>99%), the residues from the high purity, and a commercial one (>85%). The commercial acetone shows a similar result to the high purity one, which means this acetone is a good alternative for the partial purification of bromelain from pineapple peel. The process was escalated to produce a cosmetic product. The escalation had a low yield, limiting its use in the industry, yet it was possible to form an emulsion with the oily compounds for the formulation of a skin cream.

Keywords: Bromelain, proteolytic, purification.

Área: Desarrollo de nuevos productos

INTRODUCCIÓN

La piña es una fruta tropical de la familia de las bromeliaceae fundamental para complementar la dieta de los mexicanos, ya que es rica en vitaminas A, B, C y tiene actividad proteolítica debida a la bromelina que se activa por la cisteína, tiosulfato y glutatión. La bromelina y otras cisteínas proteasas son enzimas bien conocidas presentes en diferentes partes de la piña, sobre todo en la cáscara y corona. (Ketnawa, 2012) Se ha demostrado que la bromelina debe su actividad proteolítica a un grupo sulfhidrilo (-SH) propio de una cisteína-25, asemejando su actividad a la de la papaína, enzima activa de la papaya. (Clavijo, 2012)

La bromelina es una glicoproteína del grupo de las cisteínas que actúa sobre los aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas. Su pH óptimo varía con el sustrato y oscila en un rango de 5 a 8. Debido a sus características, la bromelina es utilizada en la industria cárnica (ablandador de carnes), panificación (prevención de encogimiento de la masa), complemento alimenticio y como fármaco (aumento de

absorción de medicamentos, regulación de desórdenes digestivos, enfermedades virales, propiedades antiinflamatorias y antitumorales). (Gallardo, 2008)

Actualmente, México aporta un 4% de la producción mundial de piña, representando un 0.48% en el PIB agrícola nacional; sin embargo, esto implica un incremento en la cantidad de desechos que se generan en la población. Los desechos agrícolas de bagazo de la industrialización de la piña en el país representan un 20% lo cual es un total de 12,900 toneladas de bagazo al año, de los cuales un 30% es utilizado como alimento para ganado y el resto se desecha (SAGARPA, 2017).

La gran cantidad de desechos que se generan anualmente ha originado un gran interés en el estudio y desarrollo de nuevos productos a partir de estos desechos que puedan generar algún bien a la sociedad. El propósito de este trabajo es el planteamiento de un protocolo para aprovechar las cáscaras de la piña *Ananas comosus* para la extracción y purificación de esta enzima, realizando una estandarización del proceso y probando acetona de distinta pureza para finalmente utilizarla en la formulación de un producto dermatológico contra la dermoabrasión, para reducir la apariencia o eliminar en su totalidad algunas imperfecciones como manchas y cicatrices, la cual será etiquetada y categorizada según la norma mexicana NOM-141-SSAI/SCFI-2012.

MATERIALES Y MÉTODOS

La extracción se realizó según el protocolo de Chaurasiya, *et. al.*, (2013), se licua la cascara de la piña con buffer de fosfato de potasio en relación 1:1 (p/v). Después, se filtra, y se centrifuga a 3000 g durante 30 minutos para obtener extracto claro. La purificación de la bromelina se realizó siguiendo el protocolo de (S. Ota, *et. al.*, 1964), se mezcla el extracto crudo con acetona de tal manera que esta sea el 80% del volumen total, se agita y se incuba la solución a -10°C durante 30 minutos, seguidamente se centrifuga a 3000 g por 30 minutos. Se elimina el sobrenadante y el pellet se seca a sol por dos días.

La cuantificación proteica se realizó con el método de Bradford, midiendo la absorbancia a 595 nm en espectrofotómetro de luz ultravioleta (Bradford, 1976).

La actividad enzimática se determinó por medio de un ensayo de digestión de gelatina propuesto por S. Gautam, *et. al.*, (2010). A una solución de 25 ml de gelatina (5%), se le agrega 1mL del extracto de piña y se incuba por 20 minutos a 45°C. Al finalizar el tiempo se agrega 0.1mL de peróxido de hidrógeno a la mezcla y se incuba por 5 minutos más. De ahí se mide el pH y se ajusta a 6.0 con NaOH 0.1N, seguidamente se agregan 10mL de formaldehído y se espera 1 minuto. Finalmente, titula hasta alcanzar un pH 9.0 con 0.1N NaOH y se anota el volumen agregado. La unidad de gelatina digerida (GDU) se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$GDU = \frac{(T - B) * 14 * N * 50}{\text{proteína en gramos}}$$

donde T es el volumen para el extracto, B es el volumen del blanco y N es la normalidad del NaOH usado.

La elaboración se realizó a partir de un protocolo establecido por Maru *et. al.* (2018), el cual fue a partir de dos fases: fase oleosa y fase acuosa. La fase oleosa (monoestearato de glicerol (4%), monoleato de glicerol (4%), tween (4%) y vaselina (88%)) representó el 35% del volumen final, mientras que en la fase acuosa (agua (45%) y etoxilado (5%)) se incluyó la bromelina purificada con una concentración de 3g por cada 10 de crema. La emulsión se formó mediante estrés mecánico provisto por una licuadora y el uso de un surfactante comercial. La bromelina se disolvió en el agua de la fase acuosa, mientras el surfactante se disolvió en la oleosa. La fase oleosa se calentó en una parrilla con agitación hasta obtener un líquido transparente, para posteriormente incorporar, rápidamente con agitación vigorosa constante, la fase acuosa. Finalmente se agregó agua fría en conjunto con un agente espesante comercial para brindar textura y una pequeña cantidad de aceite esencial de lavanda para proveer olor.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla I. Volumen del extracto crudo y del rendimiento en ml/g para un extracto de 33g de cascara de piña *Ananas comosus*.

	Valores para 33 g de cascara	C.V.
Extracto crudo (ml)	38.33 ± 2.5	6.5%
Rendimiento (ml/g)	1.16 ± 0.08	

Extracción

La estandarización del proceso de extracción se realizó para un estándar de 33 g de cascara de piña, los resultados se muestran en la Tabla I. El rendimiento reportado difiere con los valores obtenidos por Ketnawa et al, el cual reportó que en la piña NangLae y PhuLae, se produce un volumen de extracto crudo de 163.5ml y 154.5 ml para 100 g de cascara respectivamente, lo que se traduce en un aumento de 63% y 54% frente al volumen inicial de líquido para la extracción (Ketnawa *et al.*, 2012), mientras que en lo

obtenido con *Ananas comosus* el aumento es del 16% ± 8 del volumen de extracto final, frente al volumen de buffer usado para la extracción. Esta diferencia se puede deber a la diferencia de humedad entre los tipos de piña, así como, el líquido usado para la extracción, ya que los resultados de Ketnawa et al son con agua destilada.

Los análisis de cuantificación y actividad se realizaron con el extracto obtenido de 100 g de cascara de piña, los valores obtenidos se muestran en la Tabla II.

Los valores encontrados confirman que el proceso de extracción fue exitoso, ya que se encontró un aproximado de 100 mg de proteína en los 100 g de cascara usada. Ketnawa et al, reporta valores similares con un total de 132.4 mg de proteína en piña NangLae y 70.7 mg en la piña PhuLae (Ketnawa *et al.*, 2012). La actividad encontrada fue de 38192 GDU, lo que confirma la presencia de bromelina en extracto. Lo anterior difiere con los encontrado por Gautam et al, el cual reporta 2100 GDU para tallo y 1450 GDU para el fruto de la piña *Ananas comosus* (S Gautam *et al.*, 2010).

Tabla II. Valores de concentración, proteína total y actividad del extracto crudo de 100g de cascara de piña *Ananas comosus*.

	Valor para 100 g de cascara	C.V.
Concentración (mg/ml)	0.997 ± 0.48	48%
Proteína total (mg)	99.7 ± 48	
Actividad (GDU)	38192 ± 10529	28%

La diferencia encontrada puede deberse al buffer usado en la extracción, ya que su protocolo utiliza buffer de acetato; así mismo, la parte de la piña usada para la extracción pudo provocar la diferencia. Lo encontrado sugiere que la bromelina encontrada en la cascara tiene una mejor actividad que la encontrada en otras partes del fruto. Se debe recalcar que el C.V. es mayor al 20%, esto se debe a que las cáscaras usadas son de desecho, lo que significa que no han tenido el mismo tratamiento, lo que resulta en poca precisión en los datos.

Purificación

La estandarización del proceso de purificación se realizó con el extracto obtenido de 100 g de cascara de *Ananas comosus*. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla III.

En el proceso estandarizado con acetona de alta pureza, el porcentaje de recuperación de proteína es del 19.85 %, similar al encontrado por Chaurasiya *et al.*, el cual reportó un porcentaje de 17.55%, sin embargo, la actividad recuperada difiere enormemente entre ambos procesos, ya que en su artículo reporta un porcentaje del 85.97% (Chaurasiya and Umesh Hebbar, 2013), mientras en este protocolo se recuperó un 65.2%. Se sugiere que la diferencia está en el tipo de buffer usado, ya que lo reportado es con buffer de fosfato sódico. Otra diferencia importante en el proceso estandarizado es el incremento en el rendimiento del proceso del reportado en la literatura por Ota et al, el cual encontró que para piña Hawaiana el rendimiento es de entre 3.3 -3.7 g de extracto crudo. Esta diferencia puede deberse al tipo de piña, la parte del fruto usado y el proceso de secado, ya que Ota et al realizó la extracción del fruto completo y realizó secado por liofilización (Ota *et al.*, 1964).

Tabla III. Valores de concentración, proteína total, actividad, actividad recuperada, peso y rendimiento del extracto recuperado en la purificación de 100 g de cáscara de la piña *Ananas comosus* usando acetona de alta pureza, residual y comercial.

	Acetona Pura	Acetona Residual	Acetona Comercial
Concentración(mg/ml)	1.98 ± 0.79	3.50 ± 2.30	2.95 ± 0.55
Proteína total (mg)	19.8 ± 7.92	35 ± 23	29.5 ± 5.51
Actividad (GDU)	23040 ± 4981	12854 ± 5633	21714 ± 1626
Actividad recuperada %	65.2 ± 14.1	36.4 ± 15.9	61.5 ± 4.6
Peso (g)	0.057 ± 0.009	0.023 ± 0.006	0.066 ± 0.006
Rendimiento (g/L)	5.75 ± 0.96	2.33 ± 0.58	6.33 ± 0.58

El proceso con acetona de alta pureza es una buena alternativa para obtener buenos valores de rendimiento y recuperación de proteína en la purificación de bromelina, sin embargo, se sugiere analizar otros tipos de buffer para comprobar su efecto en la actividad recuperada.

Los resultados obtenidos de la comparación de las acetonas se muestran en la Figura 1. El análisis estadístico realizado para la concentración de proteína y la proteína total indicó que no existe una diferencia significativa entre los tres tipos de purificación.

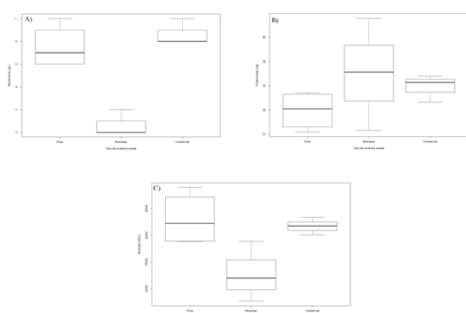


Figura 1. Diagrama de caja y bigotes con los valores de rendimiento, proteína total y actividad de los tres tipos de acetona. A) Rendimiento en g/L de la purificación con los tres tipos de acetona usados. B) Proteína total en mg del residuo de la purificación con los tres tipos de acetona usados. C) Actividad en GDU de los extractos purificados usando los tres tipos de acetona.

Esto indica que los tres tipos de acetona son capaces de purificar la misma cantidad de proteína.

En cuanto al rendimiento y la actividad se encontró que la acetona residual tiene valores estadísticamente menores que la acetona comercial y la pura, las cuales no mostraron diferencias entre ellas.

La posible explicación de los resultados de la actividad y la proteína total sugiere que, una gran parte de las proteínas obtenidas no son bromelina. Se sugiere que un alto porcentaje de la bromelina se solubilizó y el precipitado logrado fue de proteínas de menor peso. Esto, a su vez, explica que los valores obtenidos tengan un coeficiente de variación mayor al 20% (valores no mostrados), ya que en el producto recuperado puede existir una combinación de proteínas del extracto y de las encontradas en la acetona residual. El uso de la acetona reciclada no es una alternativa viable para la purificación.

Tabla IV. Resultados de concentración, proteína total, actividad, actividad recuperada, peso y rendimiento de la purificación de bromelina de cáscara de piña, para un proceso de 400 ml de extracto.

	Valores para 400 ml de Extracto de cáscara de piña	C.V.
Concentración(mg/ml)	5.01 ± 0.99	20%
Proteína total (mg)	151.33 ± 31.05	
Actividad (GDU)	40827 ± 5207	12%
Actividad recuperada %	78 ± 3.6	4.6%
Peso (g)	0.269 ± 0.05	17%
Rendimiento (g/L)	0.672 ± 0.12	

Proceso escalado de purificación

Se escaló el proceso para un volumen de 400 ml de extracto crudo de cáscara de piña, los cuales fueron purificados con acetona de alta pureza; se analizó la concentración, proteína total, actividad, actividad recuperada, peso y rendimiento del proceso de purificación. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla IV.

Los valores de concentración, y actividad son consistentes con el

escalamiento del proceso, sin embargo, la actividad recuperada y el rendimiento tienen valores. Se observa que, en la actividad recuperada, el porcentaje aumenta de un 65% a un 78%, mientras que el

rendimiento disminuye de 5.75 g/L a 0.672 g/L. La diferencia puede deberse al tiempo de incubación a -10°C , al usar 30 minutos en un volumen pequeño de extracto, se permite la precipitación de la bromelina además de otras proteínas, mientras que en un volumen mayor la precipitación es mayormente de bromelina, por eso el aumento en la actividad, sin embargo, el tiempo no es suficiente para la que toda la enzima se precipite, lo que se traduce en una pérdida de rendimiento. Se sugiere realizar un análisis para observar la relación entre el tiempo de incubación y la recuperación conforme a un cambio de volumen. Con lo anterior se puede obtener un buen producto dermatológico, sin embargo, se debe mejorar el rendimiento para uso industrial.

Elaboración de la crema

Se probó utilizar buffer en la fase acuosa, sin embargo, no fue posible estabilizar la crema por este medio por lo que se usó agua como reemplazo, este cambio resultó un éxito ya que la bromelina mostró miscibilidad con la fase oleosa después de permanecer en agitación constante. El producto final fue una crema color amarillo que presentó un aroma a lavanda y una textura suave, cremosa y firme acorde a lo encontrado en el mercado.

CONCLUSIÓN

En base a los resultados obtenidos en el proceso de extracción y purificación es posible concluir que la extracción de la cáscara de la piña *Ananas comosus* permite una la recuperación de una alta cantidad de proteína, incluyendo la bromelina, la cual posee una alta actividad. La purificación por acetona es una buena alternativa para la purificación de bromelina de la cáscara de la piña *Ananas comosus*, ya que se obtienen buenos valores de rendimiento y de recuperación, sin embargo, se sugiere probar con otros buffers para mejorar el porcentaje de la actividad recuperada.

Entre las acetonas probadas, se concluye que reciclar la acetona no es una alternativa viable para obtener un alto contenido de producto, además de que la bromelina extraída tendrá un bajo porcentaje de actividad; mientras que el uso de la acetona comercial es la mejor alternativa para la obtención de bromelina de cáscara de piña, ya que es un producto de menor precio que la de alta pureza, y al mismo tiempo no se encontró diferencia en la actividad y el rendimiento del proceso.

Al escalar el proceso se concluye que la actividad recuperada mejora al aumentar la cantidad de extracto a purificar, sin embargo, si se toma en cuenta el rendimiento, es poco factible utilizar este proceso para una producción industrial, se sugiere modificar los tiempos de precipitación a -10°C . En cuanto a la preparación de la crema, fue posible generala utilizando la bromelina como ingrediente en la fase acuosa, aunque se debe tener cuidado en la preparación para evitar su separación de la fase oleosa.

BIBLIOGRAFÍA

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-254.
- Chaurasiya, R.S., Umesh Hebbar, H. 2013. Extraction of bromelain from pineapple core and purification by RME and precipitation methods. *Sep. Purif. Technol.* 111, 90–97.
- Clavijo, D., Portilla, M., Quijano, A. 2012. *Cinética de la bromelina obtenida a partir de la piña perolera (Ananas Comosus) de Lebrija-Santander*. *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas.* 10(2):41-49
- Gallardo, L. Sánchez A., Montalvo, C., Alonso, A. 2008. *Extracción de Bromelina a partir de Residuos de Piña*. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 18, 1-4.
- Ketnawa, S., Chaiwut, P., Rawdkuen S. 2012. *Pineapple wastes: A potential source for bromelain extraction*. *Food and Bioproducts Processing*, 90(3), 385-391.
- Maru, A. D., & Lahoti, S. R. (2018). *FORMULATION AND EVALUATION OF MOISTURIZING CREAM CONTAINING SUNFLOWER WAX*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 10(11), 54.
- Ota, S., Moore, S., Stein, W.H. 1964. Preparation and Chemical Properties of Purified Stem and Fruit Bromelains. *Biochemistry* 3, 180–185.

- SAGARPA. 2017. Planeación Agrícola Nacional: Piña. Retrieved from https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257084/Potencial-Pi_a.pdf.
- Gautam, S., Mishra, S. Dash, V., Goyal, A., Rath, G. 2010. Comparative study of extraction, purification and estimation of bromelain from stem and fruit of pineapple plant. *Thai J. Pharm. Sci.* 34, 67–76.