

# UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE INGENIERIA

ESCUELA ACADEMICO PROFESIONAL DE INGENIERIA

AGROINDUSTRIAL



## “OBTENCIÓN ENZIMÁTICA DE COLORANTE NATURAL A PARTIR DE PÁPRIKA (*Capsicum annuum*)”

TESIS PARA OBTENER EL TITULO PROFESIONAL DE INGENIERO  
AGROINDUSTRIAL

TESISTAS:

Bach. Bustamante Munives Sandro Manuel

Bach. Puccier Luna Maharani Yaloha

SUSTENTADA Y APROBADA POR EL SIGUIENTE JURADO: EL DIA  
18 DE MARZO DEL 2008.

---

M.Sc. DAMIÁN MANAYAY SÁNCHEZ

PRESIDENTE

---

M.Sc. ELZA AGUIRRE VARGAS  
CALDERÓN

SECRETARIA

---

M.S. AUGUSTO CASTILLO

INTEGRANTE

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

## *Dedicatoria*

*Esta investigación esta dedicada a:*

*La memoria de mi abuelo Manuel*

*Bustamante Rivera, quien desde el cielo*

*Me guía por los Senderos de la superación.*

*Mi madre Ivonne Munives Vega, por su*

*Amor incondicional, por su cariño y compresión*

*Gracias por apoyarme siempre en toda decisión. Te*

*Dedico este sueño cumplido en mi vida y puedo decir*

*Que lo logramos a pesar de muchas dificultades.*

*Mi hermana Janina Ávila Munives, por*

*Estar siempre conmigo y haberme brindado*

*Su apoyo en todo momento, por haberme dado la*

*Alegría de tener a mi sobrina Jade M endez Ávila.*

*A una persona muy especial, con la que*

*Compartí parte de mi vida, que a pesar*

*De todo llevare siempre en mi recuerdo.*

*A mi familia en general, gracias por su confianza, paciencia y compresión.*

*Siempre sigue adelante*

*Sandro*

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

## *Dedicatoria*

*A mis padres: Gilbert Puccier*

*Y Rosa Luna, por darme la vida,*

*Educación y apoyo permanente*

*Para ser cada día mejor.*

*A mis hermanos: Lizzie, Ivan y Anahi, por*

*Su apoyo incondicional en el transcurso de mi vida.*

*Maharani*

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

## *Agradecimiento*

- ∅ *A nuestro asesor. M.S. Augusto Castillo Calderón, quien desde el principio nos apoyo de manera incondicional académicamente y moralmente, para la realización y culminación de esta investigación, quien en todo momento, fue más que un asesor, un amigo.*
  
- ∅ *A la profesora M.Sc. Elza Aguirre Vargas, quien nos indujo en un primer momento a llevar a cabo esta investigación.*
  
- ∅ *A los docente de la escuela de Ingeniería Agroindustrial, por sus enseñanzas y valioso aporte en nuestra formación académica.*
  
- ∅ *A nuestros amigos por su amistad y apoyo durante nuestros estudios universitarios, gracias por los momentos gratos compartidos.*

*Los Autores*

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo por objetivo la obtención enzimática del colorante de páprika (*Capsicum annuum*). Para ello se utilizo páprika de la variedad King, procedente del fundo San Antonio-Chimbote-Ancash, perteneciente a la corporación Social Agroindustrial Chinecas S. A, con una medida de calidad comercial de color de 147.39 grados Asta.

El páprika fue seleccionado, lavado, escaldado, troceado (1cm<sup>2</sup>) y después sometido a una hidrólisis enzimática para luego ser filtrado, secado y molido. Se estudio la etapa de hidrólisis enzimática, evaluándose los siguientes parámetros: concentración de sólidos, tiempo de hidrólisis, y concentración de enzima, que permitieron alcanzar durante la extracción la mayor concentración del colorante de Pprika.

Del estudio de la influencia de las diferentes enzimas celulasa de *Aspergillus niger*, proteasa de *Bacillus subtilis* y lipasa de *Cándida rugosa*, se observo que los mejores resultados se obtuvieron con la enzima Lipasa de *Cándida rugosa* debido a que el substrato páprika contiene pigmentos carotenoides asociados a sustancias

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

grasas, es por esto que la enzima lipasa hidroliza estas sustancias grasas a monogliceridos, eliminándolos en forma de sólidos insolubles no coloreados en el líquido sobrenadante y concentrando en el torta residual una mayor cantidad de colorante, al evaluar las condiciones de la hidrólisis enzimática se encontr que los mejores resultados se obtuvieron al utilizar una concentración de enzima 0.5 % (enzima / sustrato), grado de dilución 1:10 (sustrato/ buffer) a pH 7.0 y T = 37 ° C, páprika fresco troceado (1cm<sup>2</sup>), agitación 150 rpm. Tiempo de hidrólisis de 25 minutos.

Del análisis enzimático de la lipasa de *Candida rugosa* se obtuvo que esta enzima contiene un porcentaje de proteína del 12.426 %, un mayor rango de linealidad para una concentración de 0.5% de (enzima / sustrato), actividad enzimática teniendo como sustrato páprika de 1.796 (U/mg. de proteína bruta), los parámetros cinéticos para el sustrato páprika son Km de 535.117 ( $\mu$ moles) y Vmx de 58.823 (umoles/min).

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

---

CONTENIDO

Página

---

CAPÍTULO I

I. INTRODUCCIÓN.....1

---

CAPÍTULO II

II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....4

1. El páprika.....4

    1.1. Descripción botánica.....7

    1.2. Composición química.....8

    1.3. Variedades de páprika en el Perú .....9

    1.4. Medidas de la calidad del páprika .....10

        1.4.1. Grados ASTA.....10

        1.4.2.- Método colorimétrico.....11

    1.5. Productos derivados del páprika .....14

    1.6. Usos del páprika.....15

    1.7. Compuestos volátiles del pimiento páprika.....16

    1.8. Proceso de maduración en los frutos de pimiento.....17

2. Colorantes.....18

    2.1. Tipos de colorantes.....19

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

2.2. Características y problemática de los colorantes químicos...	22
2.3. Características y problemática de los colorantes naturales...	23
3.- Los Colorantes del páprika.....	24
3.1.- Carotenoides.....	26
3.1.1. Estructura.....	26
3.1.2. Identificación.....	26
3.2. Capsantina.....	27
3.3. Capsorrubina.....	28
3.4. $\beta$ -caroteno.....	29
4. Las Enzimas.....	29
4.1. Definición, naturaleza.....	29
4.2.- Propiedades de las enzimas.....	31
4.3. Composición y estructura de las enzimas.....	32
4.4. Mecanismos de acción enzimática.....	33
4.5. Cinética enzimática.....	35
A. Tiempo de hidrólisis.....	35
B. Concentración de enzima.....	36
C. Concentración de sustrato.....	37
D. Efecto del pH.....	38
E. Efecto de la temperatura.....	39
F. Influencia del medio de reacción.....	40
4.6.- Fuentes de las enzimas.....	41



**Obtención enzimática de colorante natural a partir de paprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

4.7.- Enzimas microbianas.....	42
4.8.- Hidrolis enzimatica.....	42
4.9. Como seleccionar la enzima.....	44
4.10. Aspectos tecnicos del trabajo con enzimas.....	45
5.- Celulasas.....	46
6. Proteasas.....	50
7. Lipasa.....	53

---

**CAPITULO III**

III. MATERIALES Y METODOS.....	56
3.1. Materiales, equipos e instrumentos.....	56
3.1.1. Materiales.....	56
3.1.1.1. Materia prima.....	56
3.1.1.2. Insumos.....	56
3.1.1.3. Reactivos.....	60
3.1.1.4. Materiales metalicos.....	60
3.1.1.5. Materiales de vidrio y otros.....	61
3.1.2. Equipos e instrumentos.....	61
3.2. Metodos de analisis.....	63
3.2.1. Descripcion de la materia prima.....	63
3.2.1.1. Caracteristicas fisicas y componentes	
Estructurales de la materia prima.....	63
3.2.1.2. Analisis proximal.....	64

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

3.2.2. Analisis de color en el páprika.....	64
3.2.2.1. Determinacion de grados ASTA.....	64
3.2.2.2. Metodo colorimetrico.....	65
3.2.3. Analisis con las enzimas.....	67
3.2.3.1. Determinacion de proteinas (metodo Bradford)	67
3.2.3.2. Determinacion de azucares reductores.....	68
3.2.3.3. Determinacion del rango de linealidad.....	70
3.2.3.4. Determinacion de la actividad enzimatica.....	71
3.2.3.5. Determinacion de los parametros cineticos.....	72
3.2.3.7. Eleccion de la variedad de páprika.....	74
3.2.3.8. Influencia de la forma a utilizar del páprika en la hidrolisis enzimatica (páprika troceado o en polvo) .....	75
3.3. Metodología experimental.....	78
3.4. Diseno experimental.....	85
3.4.1. Influencia de las enzimas en la obtencion del colorante de páprika.....	86
3.4.2. Influencia de la concentracion de enzimas en la obtencion del colorante de páprika.....	87
3.4.3. Influencia del grado de dilucion del páprika en la obtencion del colorante .....	88
3.5. Analisis estadístico.....	90

---

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

CAPÍTULO IV

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	91
4.1. Elección de la variedad de páprika.....	91
4.2. Descripción de la materia prima.....	94
4.3.1. Características físicas y componentes estructurales Del páprika variedad king.....	95
4.3.2. Características químicas.....	97
4.3. Influencia de la forma a utilizar del páprika en la hidrólisis enzimática (páprika troceado o en polvo).....	99
4.4. Influencia de las enzimas en la obtención del colorante de páprika.....	102
4.5. Influencia de la concentración de enzimas en la obtención del colorante de páprika.....	107
4.6. Influencia del grado de dilución en la obtención del colorante de páprika.....	109
4.7. Caracterización colorimétrica. coordenadas CIELab, del colorante de páprika y del colorante de páprika tratado enzimáticamente.....	112
4.8. Análisis enzimático .....	116
4.8.1. Determinación de proteínas.....	116
4.8.2. Determinación del rango de linealidad.....	117
4.8.3. Determinación de la actividad enzimática.....	120
4.9. Determinación de los parámetros cinéticos.....	122

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

---

CAPÍTULO V

V. CONCLUSIONES.....127

---

CAPÍTULO VI

VI. RECOMENDACIONES.....129

---

CAPÍTULO VII

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....130

---

INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1: Composición química proximal del páprika en Diferentes formas.....	8
Cuadro 2: Porcentaje aproximado del total de carotenoides en el páprika.....	25
Cuadro 3: Cuadro de comparación entre proceso químico y enzimático.....	43
Cuadro 4. Nomenclatura de las celulasas.....	49
Cuadro 5: Nomenclatura de las proteasas.....	50
Cuadro 6: Nomenclatura de las lipasas.....	54

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

Cuadro 7: Métodos de linealización para determinar los parámetros Cinéticos.....	72
Cuadro 8: Valores de grados Asta para las variedades de páprika analizadas.....	91
Cuadro 9: Resultados experimentales para el análisis de índice de Madurez.....	94
Cuadro 10: Componentes estructurales del páprika variedad king..	95
Cuadro 11. Composición química del páprika variedad King.....	97
Cuadro 12: Resultados para el efecto individual del páprika Troceado y páprika en polvo.....	99
Cuadro 13: Efecto del grado de dilución en la obtención del colorante de páprika.....	110
Cuadro 14. Parámetros CIELab del páprika y del páprika hidrolizado.....	113
Cuadro 15: Valores de absorbancia obtenidos para la ; determinación de proteínas por el método Bradford.....	116
Cuadro 16: Valores de $\mu\text{mol}$ ácidos producidos en el tiempo, para la enzima lipasa teniendo como substrato páprika.....	118
Cuadro 17: Concentraciones de producto formado en $\mu\text{mol}$ de ácidos producidos para determinar los parámetros cinéticos, para la enzima lipasa teniendo como substrato páprika.....	122

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

Cuadro 18: Valores para determinación Vap y Kap para diferentes concentraciones.....	124
Cuadro 19: Calculo de las inversas de v y [S] de los parámetros cinéticos.....	125

---

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Descripción sistemática del genero <i>Capsicum</i> .....	7
Figura 2. Componentes estructurales del páprika.....	7
Figura 3: Diagrama cromático en el grafico bidimensional CIELab.....	12
Figura 4: El espacio tridimensional de color con tres planos o ejes CIELab.....	13
Figura 5: Imagen del páprika en polvo.....	14
Figura 6: Imagen del páprika en oleoresina.....	14
Figura 7. Ruta biosintética de los carotenoides en los frutos del pimiento.....	18
Figura 8: Estructura del isopreno C <sub>40</sub> .....	26
Figura 9: Estructura de la capsantina.....	28
Figura 10: Estructura de la capsorrubina.....	28
Figura 11: Estructura de β-caroteno.....	29
Figura 12. Estructura de las enzimas (a) estructura primaria,	

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

(b) estructura secundaria y (c) estructura terciaria.....	30
Figura 13. Tiempo de hidrólisis y actividad enzimática.....	36
Figura 14. Efecto de la concentración de enzima sobre la velocidad de la reacción enzimática.....	36
Figura 15. Efecto de la concentración de substrato sobre la velocidad de la reacción enzimática.....	37
Figura 16. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática..	40
Figura 17. Estructura molecular de la celulosa.....	46
Figura 18: Mecanismos de acción de una exoglucanasa.....	47
Figura 19. Mecanismos de acción de una endoglucanasa o celobiohidrolasas.....	48
Figura 20. Mecanismo de hidrólisis enzimática de la celulosa.....	48
Figura 21: Estructura tridimensional celulasa de <i>Aspergillus Níger</i> .	49
Figura 22: Estructura tridimensional de proteasa de <i>Bacillus subtilis</i> .....	51
Figura 23. Mecanismos de acción de las proteasas.....	51
Figura 24: Estructura tridimensional de lipasa de <i>Candida rugosa</i> .	54
Figura 25. Mecanismos de acción de las lipasas.....	55
Figura 26. Imagen del colorimetro Chroma Meter (Konica Minolta) Modelo CR-400, y del Software Oncolor.....	66
Figura 27. Grafica de las dobles reciprocas de Lineweaver y Burk que modifica la ecuación de Michaelis-Menten.....	73

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

Figura.28. Diagrama de flujo para el proceso general de obtención Enzimática de colorante natural a partir de páprika.....	78
Figura 29. Fotografía del páprika .....	79
Figura 30. Fotografía del páprika seleccionado .....	79
Figura 31. Fotografía del (a) páprika lavado, (b) inmersión del páprika en solución desinfectante .....	80
Figura 32. Fotografía del páprika por inmersión en agua caliente...80	
Figura 33. Fotografía del páprika troceado.....	81
Figura 34. Fotografías del reactor enzimático y de sus accesorios, en diferentes vistas.....	82
Figura 35. Fotografías del líquido sobrenadante filtrado.....	83
Figura 36. Fotografías del (a) Pprika troceado luego de a hidrólisis Enzimática, (b) Pprika troceado colocado en la bandejas del estufa.....	83
Figura 37. Fotografías (a) Pprika troceado luego del secado, (b) Enfriamiento del producto secado en el desecador.....	84
Figura 38. Fotografías del (a) Pprika molido, (b) páprika tamizado, (c) páprika en polvo obtenido enzimáticamente.....	84
Figura 39. Esquema del Diseño Experimental.....	85
Figura 40. Fotografías de los componentes estructurales del páprika variedad king.....	96



**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

Figura 41. Fotografías del filtrado de páprika en polvo.....	100
Figura 42. Representación grafica del efecto individual del páprika (troceado y en polvo).....	101
Figura 43. Fotografía del filtrado de páprika troceado.....	102
Figura 44. Efecto de las enzimas en la obtención del colorante de páprika.....	103
Figura 45. Representación grafica de concentración de la enzima lipasa en la obtención del colorante de páprika.....	107
Figura 46. Fotografías del colorante de páprika king y del colorante obtenido enzimaticamente en cada parámetro seleccionado.....	112
Figura 47. Representación grafica del rango de linealidad de la lipasa de <i>Candida rugosa</i> teniendo como substrato páprika.....	119
Figura 48. Representación grafica de la actividad enzimática de la lipasa de <i>Cándida rugosa</i> teniendo como substrato páprika.....	120
Figura 49. Determinación de los parámetros $V_{ap}$ y $K_{ap}$ a diferentes concentraciones de substrato.....	124
Figura 37: Determinación de los parámetros cinéticos $V_{máx}$ y $K_m$ , para la enzima lipasa teniendo como substrato páprika.....	126

---

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

---

INDICE DE ANEXOS

Página

---

Cinética de Hidrólisis enzimática de la celulasa.....	Anexo A1
Determinación de la actividad de la lipasa de <i>Candida</i> <i>rugosa</i> .....	Anexo A2
Detección de Proteínas totales por espectrofotometría .....	Anexo A3
Análisis estadístico de los resultados obtenidos en el diseño experimental.....	Anexo B

---

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

## I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años el mercado mundial de colorantes naturales ha crecido significativamente debido a las preferencias a consumir productos naturales no dañinos para la salud y las instituciones por utilizarlos cada vez como productos alternativos de producción.

El pimiento páprika, fuente natural de pigmentos, es de gran importancia debido a que se trata de productos naturales atxicos ampliamente utilizados en la industria alimentaria, farmacia y cosméticos, sustituyendo a otros aditivos de síntesis o minerales que pueden ser tóxicos a largo plazo.

El color es el componente primario de la apariencia total de un producto, así como un indicador de la calidad del mismo. En el páprika los pigmentos responsables del color rojo anaranjado son los carotenoides.

El valor del páprika y de aquellos que contienen carotenoides esta condicionado no solo a las características conferidas por la especia sino también por su importancia biológica y fisiológica en la industria alimentaria, debido a que algunos pigmentos colorantes son

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

de naturaleza provitamnica y pueden transformarse en vitamina A, durante la digestión.

Es de gran importancia desarrollar nuevas alternativas en la producción de agroalimentos, como es el caso de los colorantes, por eso esta investigación puede ser una alternativa que permitirá solucionar la demanda de colorantes naturales ya que de muy pocos productos naturales se est extrayendo colorantes, y de aquellos que se est extrayendo sus precios son elevados y escasos, por lo que las industrias utilizan colorantes artificiales por el bajo costo, tipo de colorante, intensidad de color. Por lo que el colorante extraído del fruto de páprika es un buen candidato para subsanar esta demanda, debido a que la demanda mundial ha crecido significativamente, esta tendencia se ha reflejado en las exportaciones peruanas, puesto que nuestro país representa una potenciabilidad muy interesante por su capacidad productiva de este producto.

De otra parte, el empleo de enzimas en la extracción de colorantes a partir de páprika permitirá dejar de lado las sustancias químicas utilizadas en los métodos de extracción empleadas actualmente en la industria. Además de darle un valor agregado a este producto, por lo que es una nueva tecnología.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

Es por esto que el presente estudio de investigación tiene por Objetivo General Evaluar la obtención enzimática del colorante de páprika (*Capsicum annuum*). Para lo cual se propone determinar la enzima más adecuada para esta obtención y los parámetros adecuados de concentración de sólidos, tiempo de hidrólisis, y concentración de enzima, que permitan alcanzar, la mayor concentración de colorante de Pprika. Además de realizar el análisis enzimático de la enzima más adecuada para esta obtención y los parámetros cinéticos para el substrato páprika.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de paprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

## II. REVISION BIBLIOGRAFICA

### 1.- EL PAPRIKA (*Capsicum annuum*)

El fruto del pimiento, es un ovario carnoso de color verde cuando esta inmaduro y rojo intenso cuando esta maduro. La pared exterior es carnosa y gruesa. (Nuez, 1996 citado por Barba et al., 2002).

El paprika (*Capsicum annuum*), es el nombre con el que se conoce a un pimiento no pungente y dulce de forma alargada, rico en carotenoides. Comunmente puede denominarse como Pimiento o ají dulce (Perú), Paprika (en idioma aleman) y red pepper (en ingles).

El pimiento de paprika es una hortaliza herbacea del genero *Capsicum* de la familia *Solanacea*, de habito perenne en condiciones naturales, pero es cultivada anualmente en la mayoría de los casos, debido a la susceptibilidad a heladas y danos por enfriamiento, la diversidad existente entre los cultivares en cuanto a las características del fruto, forma, tamano, color, pungencia es tan grande que ha dado origen a diversas clasificaciones. Es de tallos ramificado de 0.5 a 1.5 metros de altura. La epoca de siembra es en los meses de primavera (finales de agosto y todo septiembre) su

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de paprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

periodo vegetativo es de aproximadamente 5 a 6 meses, dependiendo de la variedad y zona de cultivo. ([Davila, 2005](#)).

Cuando el fruto madura se torna rojo y esta es la principal caracteristica del Paprika debido a un grupo de pigmentos carotenoides, principalmente capsantina, capsorrubina y criptoxantina. Estos pigmentos enmascaran pigmentos tipo b-caroteno y violaxantina, que dan lugar al llamativo color amarillo en algunos tipos de pimienta. La coloracion de los frutos es favorecida por condiciones moderadas de temperaturas. ([Casas, 2002](#)).

Es originario de America del Sur, desde los tiempos de la conquista espanola muchas variedades de la especie *Capsicum annuum*, L fueron llevadas junto a otras especies del mismo genero *Capsicum* a Europa, incluso posteriormente de Europa llegaron a EEUU con mas rapidez que la llegada de especies desde el Sur y Centro de America. Con los anos se desarrollaron y crearon nuevas variedades de pimientos como en el caso del paprika de las cuales actualmente algunas de estas variedades son cultivadas en la costa Peruana. ([Derinat, 2003](#))

El paprika pertenece al Sector Agro No Tradicional. Ademas precisa que este primer trimestre del 2007 el porcentaje de destino de las exportaciones peruanas se ha visto cambiado siendo ahora la

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

nueva conformaci3n de proporciones los tres países que concentran el 95% de lo exportado, España con el 40% (US\$ 21 millones 943 mil), EE.UU. con 30% y (US\$ 16 millones 427) y México con 25% (US\$ 13 millones 695 mil). Otros países compradores, pero con montos menores, son Israel que ocup3 el cuarto lugar al comprar páprika por US\$ 987 mil, Países Bajos por US\$ 364 mil y Chile con US\$ 350 mil. Los otros 19 países restantes adquirieron páprika por montos menores a los US\$ 200 mil. ([Duarte, 2007](#)).

Las principales zonas de producci3n en el Perú son: Arequipa, Ica, La libertad, Lima, Ancash, Lambayeque y Piura, El páprika del Perú es muy cotizado en el mercado internacional ya que tiene un alto contenido de color valor ASTA. ([Cepes, 2007](#)).



**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

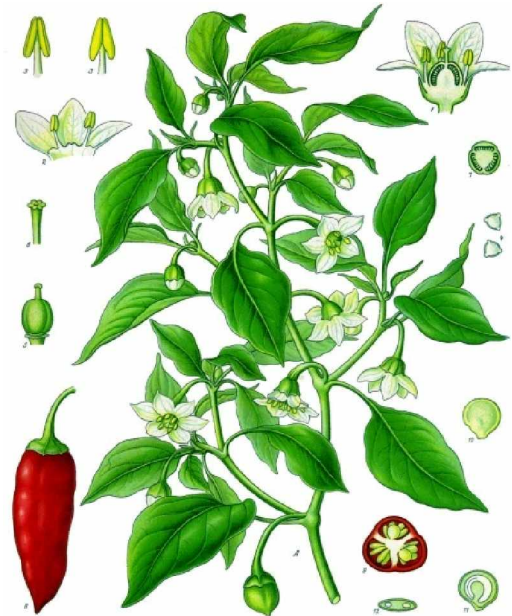
*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

**1.1.- DESCRIPCIÓN BOTÁNICA**

La descripci3n sistemática de la especie *Capsicum* es la siguiente:

Divisi3n : Faner3gamas  
Subdivisi3n : Angiospermas  
Clase : Dicotiled3nas  
Subclase : Simp3tala  
Orden : Tubifloras  
Suborden : Solaninas  
Familia : Solanáceas  
Subfamilia : Solaneanas  
Tribu : Solaninas  
Genero : *Capsicum*  
Especie : *annuum*



*Capsicum annuum* L.

Figura 1: Descripci3n sistemática del genero *Capsicum*. (Koeh, 2007)

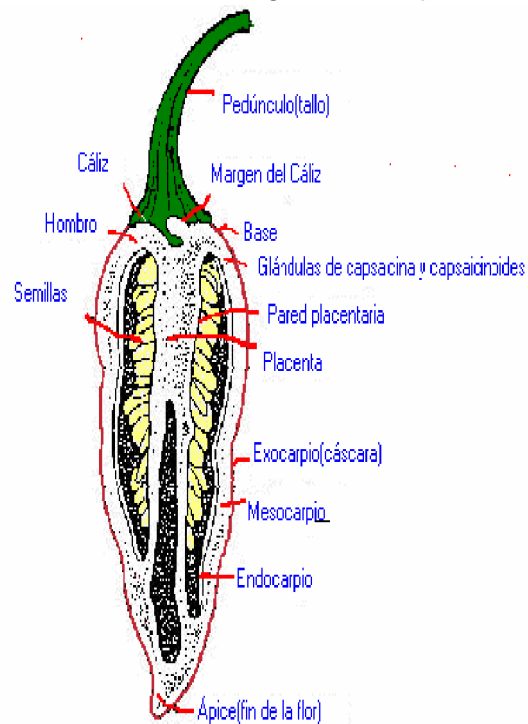


Figura 2. Componentes estructurales del páprika. (Zarc Internacional INC, 2001).

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

**1.2.- COMPOSICIÓN QUÍMICA**

En el cuadro 1, se observa la composición química proximal del páprika, para el páprika fresco recién cosechado; como para el páprika seco, el cual sufre el proceso de secado solar y para el páprika en polvo obtenido después de una etapa de molienda, llamado este producto en polvo, como colorante de páprika. (Santamaría et al, 2000).

Cuadro 1: Composición Química Proximal del P prika en diferentes presentaciones.

Componentes	Fruto Fresco(*)	Fruto Seco(*)	En Polvo(**)
Humedad	74	8	6.0-14.5
Proteínas(gr.)	4.10	15	12-15
Grasas(gr.)	2.30	11	6.2-15.3
Carbohidratos(gr.)	18	33	30-35
Cenizas(gr.)	-	-	5.0-7.0
Fibra cruda(gr.)	18	18	17.0-25.0
Calorías (cal)	94	2.91	-
Calcio (mg.)	58	150	-
Fósforo(mg.)	101.0	0	-
Hierro (mg.)	2.90	9.0	-
Tiamina (mg.)	0.25	0.60	-
Riboflavina (mg.)	0.20	0.50	-
B-caroteno (UI)	7140.00	1000.00	-

Fuente: \* (IPEH, 2004); \*\* (Santamaría et al, 2000)

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

### 1.3.- VARIETADES DE PÁPRIKA EN EL PERU

Las variedades de Pprika cultivadas actualmente en Perú, son los siguientes: Ppri- Queen y Ppri – King, luego se fue cultivando otras como Jaranda , Sonora, Olex, Lorca e Inca donde todos son de fruto alargado excepto "Lorca" fue redondo tipo pimienta. Tambien se siembra Papri- Ace (híbrido), Papri mil II, Papri-Suprime y Bigstar. (Nicho, 2001).

*1.3.1.- Papri king:* El fruto producido por esta variedad tiene una longitud promedio de 15.2 a 20.3 cm. El fruto es de paredes delgadas con un excelente color rojo y bajos niveles de capsaicina (picante).

*1.3.2.- Papri Queen:* Produce frutos de paredes delgadas, de largo ligeramente menor que Papri King con un promedio entre 15 a 18 cm. pero de hombro mucho más ancho, con un color rojo intenso; de buena capacidad de secado. (Basurto, 2001)

*1.3.3.- Sonora:* Pimiento tipo Anaheim está caracterizado por excelentes cosechas de frutos grandes y uniformes. Produce frutos de (1.7 x 20 cm.) con dos celdas lisas y de paredes gruesas. Es una planta erecta, de tamaño mediano con madurez precoz. El fruto madura hacia el verde rojo oscuro y tiene muy altos niveles de ASTA. (Basurto, 2001)

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

**1.4.- MEDIDAS DE LA CALIDAD DEL PÁPRIKA**

El principal parámetro usado para la evaluación comercial de la calidad del páprika es el color. ([Mínguez-Mosquera et al, 1992](#)).

**1.4.1. Grados Asta**

A nivel internacional, el método más aceptado para determinar analíticamente la calidad de Pprika es el fijado por la American Spice Trade Association ASTA – que establece los grados ASTA en base del color de la muestra.

El termino ASTA refiere al estándar Internacional para la medición de las unidades de color extraíble de los frutos fresco y en forma de polvo de páprika (A.S.T.A, 2004). Fundada en 1907, esta organización tiene su sede central en Washington, EE.UU. y agrupa más de 200 entidades relacionadas con el comercio de especias y es la encargada de establecer parámetros físico-químicos y validar métodos de ensayo específicos. Además brinda apoyo técnico para la elaboración de normas de calidad relacionadas con hierbas aromáticas y semillas ([A.S.T.A, 2004](#))

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

El método ASTA para la estimación del color del páprika por extracción de sus pigmentos con acetona como disolvente selectivo, a pesar de su objetividad, tampoco es totalmente suficiente, ya que la presencia notable de la clorofila en los frutos maduros de algunas variedades, modifica la estimación visual del color sin que se la detecte en el valor ASTA. Para tratar de obviar este problema se pueden utilizar en la actualidad Métodos Colorimétricos. ([Navarro et al, 1993](#)).

#### 1.4.2.- Método Colorimétrico

La colorimetría es el único de los métodos físico-químicos que no requiere la destrucción de la muestra. Para evaluar la medición se utiliza un aparato denominado colorímetro.

En el caso de las variedades rojas se realizan mediciones de color tanto en las zonas más coloreadas como en las menos coloreadas. En cambio, en las variedades verdes y amarillos se miden varios puntos y se hace un promedio.

La función del colorímetro es describir la coloración objeto de la medición. Para ello se tienen tres parámetros,  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , siguiendo el estándar C.I.E.  $L^*a^*b^*$ . ([Brezmes, 2001](#)).

## Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika (*Capsicum annuum*)

Bach. Sandro Bustamante Munives

Bach. Maharani Puccier Luna

La CIE (Comisión Internacional de Iluminación) adoptó en 1976 el sistema C.I.E.L\*a\*b\*. Este define las coordenadas cromáticas L\*a\*b\*. Representado en un grafico bidimensional los valores de a\* y b\* para un valor de L\* determinado en un diagrama cromático.

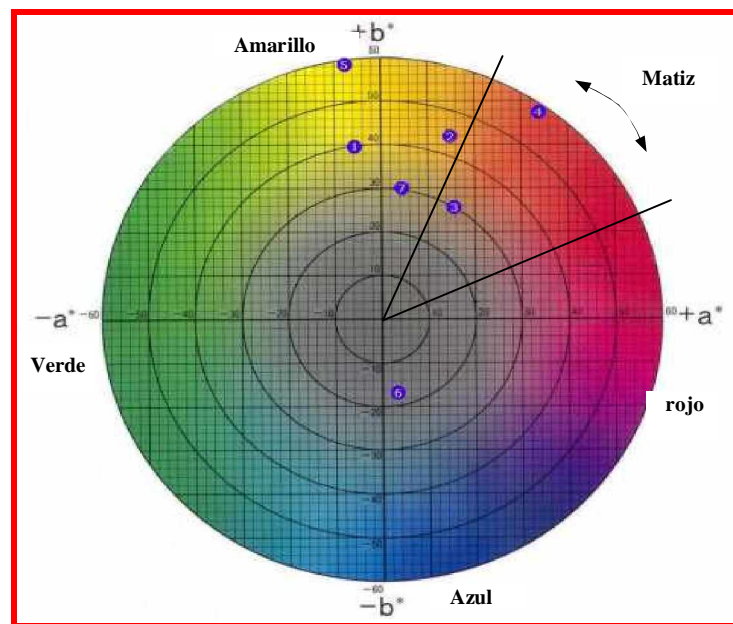


Figura 3: Diagrama cromático en el grafico bidimensional CIELab  
(Maynero, 1997)

La luminosidad viene descrita por L\*. El color negro presenta una luminosidad de 0 mientras que el blanco presenta una luminosidad de 100. Los parámetros a\* y b\* se utilizan para evaluar la saturación y el tono. La saturación nos da la pureza de un color y el tono es el color propiamente dicho.

## Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika (*Capsicum annuum*)

Bach. Sandro Bustamante Munives

Bach. Maharani Puccier Luna

Los valores de  $a^*$  y  $b^*$  están relacionados con el tono ( $h_{ab}$ ) y la saturación o chroma ( $C_{ab}$ ) por las siguientes expresiones: (Maynero, 1997)

$$h_{ab} = \arctan(b^*/a^*)$$

$$C_{ab} = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

La diferencia de color entre una muestra y una muestra patrón se determina mediante la siguiente expresión.

$$\text{Diferencia de color: } \Delta E = \sqrt{(a^*_1 - a^*_2)^2 + (b^*_1 - b^*_2)^2 + (L^*_1 - L^*_2)^2}$$

Donde: (2) muestra patrón, (1) muestra.

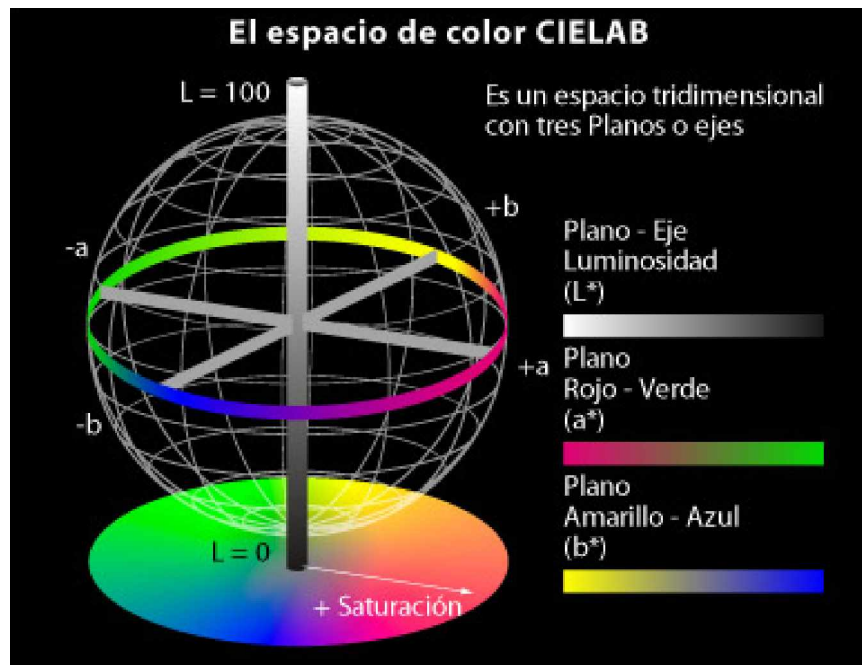


Figura 4: El espacio tridimensional de color con tres planos o ejes CIELab. (Boscarol, 2007)

## **Obtención enzimática de colorante natural a partir de paprika (*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

### 1.5. Productos Derivados del Paprika

Los principales productos obtenidos a partir del paprika son:

#### El Paprika en polvo:

Es obtenido de frutos maduros limpios, deshidratados y molidos del *Capsicum annuum*, para obtener una paprika en polvo.

El producto es fabricado, empacado, almacenado y transportado de acuerdo a las normas de fabricacion vigentes



Figura 5: Imagen del paprika en polvo ([Basurto, 2001](#))

#### Oleoresina de Paprika

Es un extracto lıquido que contiene los compuestos del paprika y se presenta como un aceite de viscosidad media con un intenso color marron rojizo oscuro rojo aroma tıpico del paprika y muy rico en carotenoides.



Figura 6: Imagen del paprika en oleoresina ([Basurto, 2001](#))



**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

### 1.6. Usos del Pprika

Los principales usos del Pprika son los siguientes. (Yamamoto, 1995)

a.- En la industria alimentaria: como colorante natural y para dar sabor a las comidas., en la fabricación de carnes elaboradas, especies mixtas, sopas, salsas y también en la elaboración de aceite esencial u oleorresinas

b.- En la industria farmacéutica: es empleado bajo la forma de oleorresina, la cual es usada como estimulante efectivo tanto internamente como externamente. Cuando es tomado internamente generalmente es ingerido en la forma de tintura y actúa como carminativo aliviando la flatulencia gástrica. Externamente es aplicado en la forma de tintura unguento y/o emplasto, impregnado en algodón actuando como frotación dando alivio al reumatismo, lumbago y neuralgias.

c.- En la Industria de cosméticos: es usado para dar color a lápices y polvos para maquillaje

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

1.7.- Compuestos volátiles del Pimiento Pprika

(Mater, 1997 citado por Dávila, 2005), realizó un estudio donde detectó 61 sustancias de las cuales 55 fueron tentativamente identificadas y 24 de estos se encuentran presentes en todas las muestras.

Las sustancias pertenecientes a los grupos químicos: cidos(6), alcoholes(4), aldehídos(8), alcanos(1), anillos aromáticos(1), esteres(1), éteres(4), cetonas(5), lactonas(1), compuestos nitrogenados(4), fenoles(20).

Cuantitativamente los principales componentes son:

- Ø cido acético
- Ø 1,3 y 2,3-butanodiol.
- Ø Acetoina
- Ø 3-metilbutanal
- Ø Acetato de etilo
- Ø Dinetoxifenol.

La presencia de productos de autoxidación en pimientos frescos y procesados se ven favorecidas por el alto nivel de insaturación de los ácidos grasos del páprika.

El compuesto 2-metoxi-isobutilpirazina, es el responsable del aroma característico del pimiento.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

1.8.- Proceso de Maduración en los frutos de pimiento.

En los pimientos se producen una serie de cambios en sus pigmentos durante el proceso de maduración de los frutos. El color verde del fruto desaparece volviéndose al final de un color rojo intenso que se debe a la presencia de carotenoides oxigenados, especialmente capsantina y capsorrubina. En relación con estos cambios de pigmentos en el fruto, probablemente tengan lugar dos procesos metabólicos simultáneos. Uno de ellos dará lugar a una nueva síntesis de pigmentos carotenoides. La existencia de este último proceso parece evidente, ya que el contenido total de carotenoides en los frutos maduros, con respecto a los frutos que han iniciado la madurez, puede variar desde el doble hasta más de 100 veces. ([Zapata et al, 1992 citado por Ascarza, 2003](#)).

En la figura 7, se resume la teoría generalmente aceptada sobre la caroteno-génesis de los pimientos rojos. En cuanto a la pérdida de color de los frutos una vez cosechados, se han de considerar el grado de madurez, la época de recolección y otros factores ambientales, las condiciones de almacenaje juegan un importante papel en la estabilidad de los pigmentos en el fruto. ([Nuez et al, 1986 citado por Ascarza, 2003](#)).

## Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika (*Capsicum annuum*)

Bach. Sandro Bustamante Munives

Bach. Maharani Puccier Luna

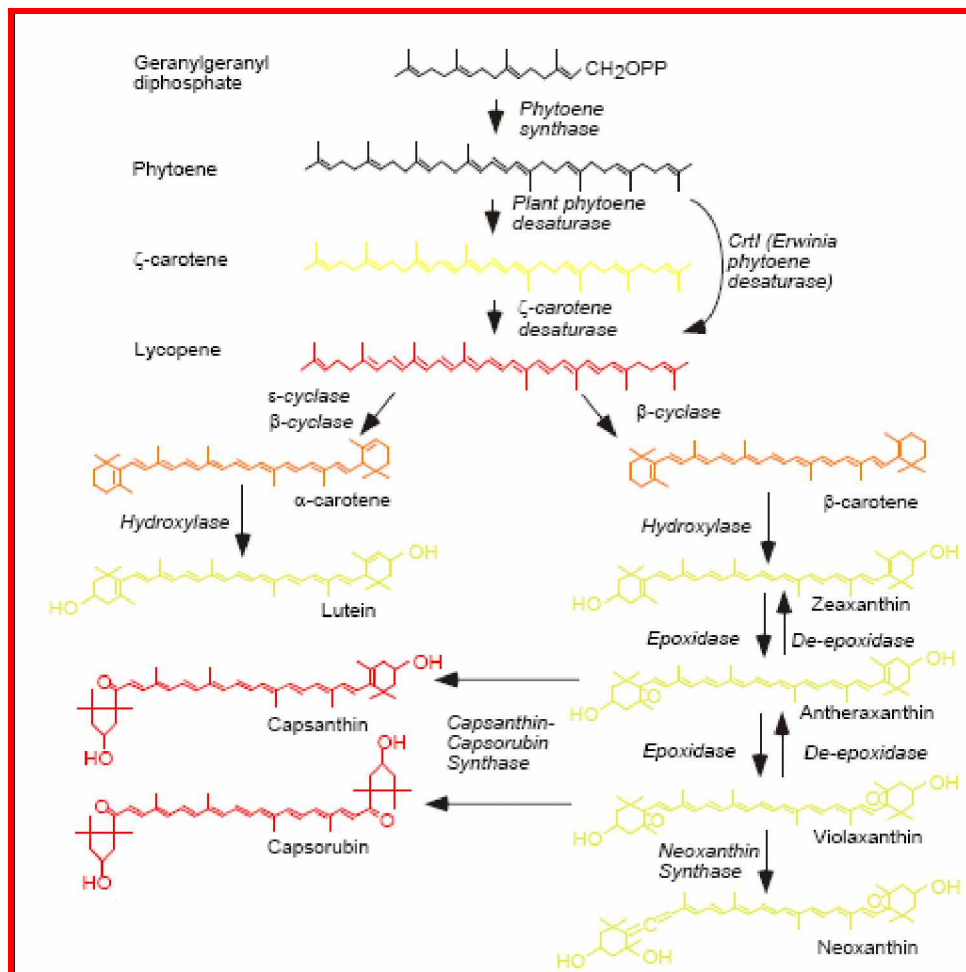


Figura 7. Ruta Biosinttica de los carotenoides en los frutos del pimiento (Nuez et al, 1986 citado por Ascarza, 2003).

## 2.- COLORANTES

Con respecto a los colorantes, un aditivo colorido de acuerdo a la FDA es cualquier colorante, pigmento u otra sustancia obtenida por síntesis o artificio similar o extraído, aislado o derivado, con o sin intermediarios del cambio final de identidad a partir de un vegetal, animal, o mineral u otra fuente y que cuando es aplicada a los alimentos, medicamentos o cosméticos, al cuerpo humano o a

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

cualquier parte, por si misma es capaz (sola a través de una reacción con otra sustancia) de impartir color. Esta definición trata de englobar tanto su fuente de procedencia como las partes donde puede ser aplicado el colorante ([Tofaya y García, 1993 citado por Delgado, 2002](#))

## 2.1.- Tipos de Colorantes

Los colorantes pueden ser clasificados de diversas formas, de acuerdo a su procedencia o fuente de origen, en su certificación, o por un grupo cromóforo esto es, el radical que le confiere un determinado color.

De acuerdo a su origen o procedencia, los colorantes son obtenidos por fuentes naturales o producidas por síntesis química (sintéticos) incluyendo a los idénticos a los naturales ([Tofaya y García, 1993 citado por Delgado, 2002](#)).

*Los colorantes naturales* son aquellos pigmentos que son obtenidos por fuente animal, vegetal, microbiana o mineral. Los colorantes microbianos y minerales se caracterizan por su uniformidad, es decir contener un solo pigmento. Sin embargo el color característico de frutas y vegetales, flores normalmente no es producido por un solo pigmento, pero si por una combinación o un

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

sistema de pigmentos. Uno de los sistemas más simples ocurre en la mora o zarzamora, que contiene principalmente un pigmento (ciadita-3-glucosidico). Sistemas más complejos han sido encontrados en arándanos, que contiene hasta 15 pigmentos. Usualmente las frutas y vegetales contienen de 4 a 6 pigmentos ([Newsome, 1986](#)).

Los colorantes idénticos a los naturales son contraparte sintética de los colorantes obtenidos de fuentes naturales. Es decir que los pigmentos naturales han sido sintetizados mediante procesos químicos. Así se tiene en el mercado carotenoides puros, incluyendo cantaxina sintéticas (rojo), apo-carotenal (naranja-rojo), y el beta-caroteno (amarillo-naranja) ([Newsome, 1986](#)).

*Los Colorantes Sintéticos* son aquellos sintetizados por procesos químicos y no son semejantes a los naturales. Estos son los de mayor demanda comercial, Existen dos tipos de aditivos coloreados certificados: tintes FD&C y las lacas FD&C.

*Los tintes FD&C* son compuestos solubles en agua. Son manufacturados en forma de polvos gránulos, líquidos, mezclas, pastas y dispersiones. El uso comercial de estos incluye una variedad de productos alimenticios, bebidas carbonatadas, refrescos,

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

mezclas secas, productos lácteos, salsas y comida para mascotas.  
([Newsome, 1986](#)).

*Las Lacas FD&C* son hidratos de aluminio de los tintes formados por extensión química del tinte correspondiente a un sustrato de hidrato de aluminio. El contenido del tinte varía de 10 a 40 %. El color de las lacas se manifiesta a través de la dispersión en vez de la solubilización como en los tintes. Aplicaciones comerciales importantes de lacas incluyen productos a base de aceite y otros productos que no contienen suficiente humedad para la solubilización de un tinte. Aplicaciones tpicas incluyen mezcla para queques y rosquillas, caramelos, productos de goma y muchos otros. Las lacas generalmente son más estables que los tintes. ([Newsome, 1986](#)).

La clasificación con base en su certificación, se agrupa en dos bloques: 1) aquellos colorantes que no requieren certificación y 2) los que requieren de certificación. Los primeros incluyen a los colorantes obtenidos de fuentes naturales, así como a los idénticos a los naturales. Los segundos incluyen a las sustancias químicamente sintetizadas con alto grado de pureza.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

## 2.2. Características y Problemática de los Colorantes Químicos

Los colorantes s nteticos han demostrado ser mejores a los naturales en su uniformidad, valor tintóreo, así como en sus propiedades de aplicación. Comparados con los colorantes de origen natural, los químicos presentan las siguientes ventajas:

-   Gran firmeza de color.
-   Alta efectividad.
-   Amplio intervalo de tinte.
-   Baja variación de lote a lote.
-   Bajo costo en su uso.
-   No presenta aromas o sabores de especias.

Por lo anterior se desarrollaron un gran numero de colorantes s nteticos, de tal forma que, los últimos 130 años, varios millones de compuestos químicos coloridos fueron, sintetizados, de los cuales 10,000 son o han sido producidos a escala industrial, tratando en muchas ocasiones de sintetizar productos idénticos a los naturales como el  $\beta$ -caroteno. De entre los diferentes tipos de colorantes s nteticos destacan los llamados azo, las antraquinonas, los indigoles, los estribenos y triarilmetanos como los de mayor volumen producido.



**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

Sin embargo, a pesar de las buenas propiedades de los colorantes sintéticos estos poseen una gran desventaja, muchos causan problemas para la salud como alergias, asma, rinitis, hiperactividad y otros. Actualmente, después de una larga serie de adicciones, deleciones y estudios solo se aceptan en los EE.UU. 9 colorantes sintéticos con severas restricciones en su uso y de acuerdo con la FDA solo 8 son comercialmente viables.

Los colorantes artificiales han perdido popularidad porque se requieren de productos con mejor calidad nutricional, ya que la mayoría de los consumidores buscan bebidas saludables; por ejemplo enriquecidas con vitaminas y provitaminas. No obstante, muchos de los colorantes artificiales tienen problemas técnicos cuando se tratan de mezclar con estas sustancias. ([Tofaya y García, 1993 citado por Delgado, 2002](#)).

### 2.3. Características y Problemática de los Colorantes Naturales

Actualmente hay un considerable interés en el desarrollo de los colorantes naturales. Esto se debe, por un lado, a la necesidad de expansión de la variedad de colorantes y por otro a la implicación de que son naturales, y por ello seguros. Esto último es la mayor ventaja de estos.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

Los colorantes naturales presentan grandes problemáticas, como por ejemplo su inestabilidad. El pH afecta al mismo compuesto haciendo que este cambie de color. También pueden ser afectados por la luz, el oxígeno, altas temperaturas, etc. La solubilidad de estos es también importante, pues muchos no son solubles en fases acuosas haciendo difícil su aplicación.

A pesar de estas desventajas, el aumento de la tecnología permite trabajar con estos colorantes para hacerlos más estables y fáciles de manejar. Se tiene por ejemplo al ácido carminico (extracto de cochinilla) el cual tiene poca estabilidad, sin embargo al convertirlo en laca de carmín, su estabilidad aumenta grandemente sin perder su valor tintóreo. ([Tofaya y García, 1993](#) citado por [Delgado, 2002](#)).

### 3.- LOS COLORANTES DEL PÁPRIKA

Muchas flores, frutas y vegetales poseen coloraciones rojas, amarillas y anaranjadas debido a los carotenoides. Estos pigmentos liposolubles se localizan generalmente en organelos subcelulares llamados cromoplastos. La mayoría de plantas lo sintetizan para protegerse de procesos foto-oxidativas jugando un papel importante en el rol de la protección de células y organismos contra los efectos de la luz, oxígeno libre y pigmentos fotosensibles. ([Viljamen et al, 2002](#) citado por [Dávila, 2005](#)).

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

El color rojo brillante de las preparaciones a partir de páprika se relaciona principalmente por la presencia de dos compuestos carotenoides oxigenados (xantofilas): capsorrubina y capsantina, que estando presentes como ácidos grasos esterificados en forma de monoesteres(26%), diesteres(54%) y en forma libre(20%). (Weissenberg et al, 1997 citado por Dávila, 2005).

El porcentaje aproximado de carotenoides en el páprika, se presentan en el cuadro 2.

Cuadro 2: Porcentaje aproximado del total de carotenoides en el páprika

Pigmentos	Porcentajes
Capsantina	52 – 60
Capsorrubina	10 – 18
Beta-caroteno	8 -13
Zeaxantina	8 -10
Luteína	8 – 10
Cryptoxantina	3 -5

Fuente: (Purseglove, 1981)

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

**2.1.- CAROTENOIDES**

Los carotenoides o tetraterpenoides son una clase de pigmentos terpenoides con 40 átomos de carbono derivados biosintéticamente a partir de dos unidades de geranil-geranilpirofosfato, en su mayoría son solubles en solventes apolares y de coloraciones que oscilan entre el amarillo (por ejemplo el  $\beta$ -caroteno) y el rojo (por ejemplo el licopeno).

Los carotenos solo contienen carbono e hidrógeno (por ejemplo el  $\beta$ -caroteno, el licopeno, etc.), mientras que las xantofilas contienen además oxígeno (por ejemplo la luteína). En general para los carotenos se usa el sufijo eno, y para las xantofilas el sufijo ina.

**2.1.1.- Estructura**

El esqueleto carbonado básico de un carotenoide es el isopreno ( $C_{40}$ ) y puede ser modificado de diversas maneras por los Grupos terminales R de  $C_9$  (Lock, 1997).

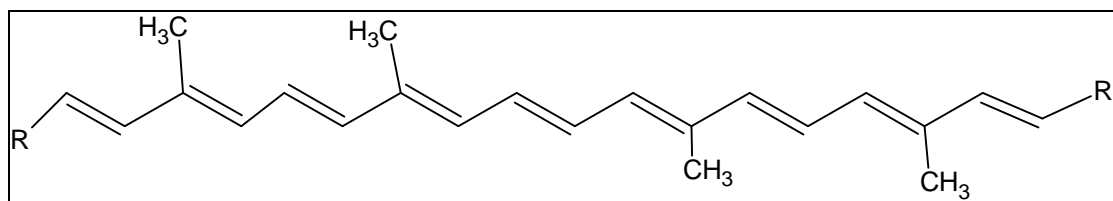


Figura 8: Estructura del Isopreno  $C_{40}$  (Lock, 1997).

**2.1.2.- Identificación**

Los espectros en la región visible de los carotenoides son muy característicos entre 400; 500 nm, con un pico mayor alrededor de

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

450 nm, y usualmente dos picos menores, uno a cada lado. La posición exacta de los tres máximos varia de compuesto y son suficientemente diferentes como para ser utilizados como medio de identificación. ([Lock, 1997](#))

## 2.2.- Capsantina

La capsantina es un pigmento que se encuentra en los pimientos rojos junto con otros carotenoides como la capsorrubina. La capsantina es la que aparece en mayor proporción, llegando a proporciones del 60 % del conjunto de todos estos carotenoides. La capsantina presenta propiedades antioxidantes, por lo que ayuda al organismo a liberarse de los radicales libres y ejerce fundamentalmente una función anticancerígeno al inhibir el crecimiento de células cancerosas. Su poder como antioxidante es superior al de los betacarotenos.

Este componente aparece fundamentalmente en los frutos rojos bien maduros del pimiento y en el pimentón que es el polvo que se obtiene al triturar estos frutos. De hecho el pimentón es la principal fuente de extracción de este componente para la elaboración de suplementos de capsantina. ([Botanical, 2001](#))

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

(Lock, 1997). La capsantina ( $C_{40}H_{56}O_3$ ) es el (3.3-dihidroxi- $\beta$ - $\kappa$ -caroteno-6-ona). Se presenta en forma de agujas de color rojo-carmín. Pf: 181-182 C

Ø En ( $CHCl_3$ ) su  $\lambda_{máx}$  es 482 nm con una  $[a]_{cd} +36^\circ$

Ø En (ter de petróleo) su  $\lambda_{máx}$  es entre 466 y 496 nm

Ø En (benceno) su  $\lambda_{máx}$  esta entre 486 y 520 nm.

Ø Es soluble en metanol, etanol, éter, benceno; ligeramente soluble en éter de petróleo y  $CS_2$ .

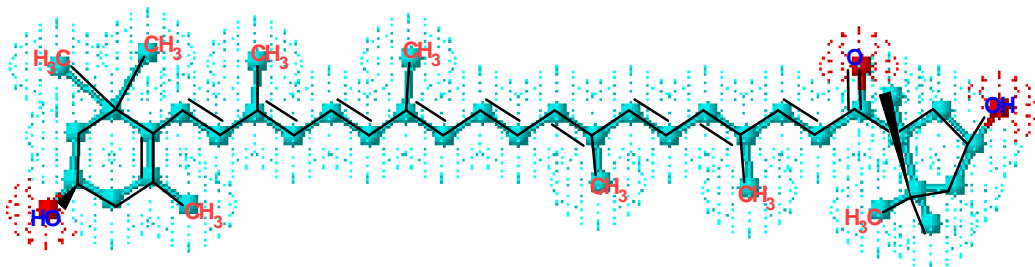


Figura 9: Estructura de la Capsantina. (Lock, 1997)

### 2.3.- Capsorrubina

Según (Lock, 1997), la capsorrubina ( $C_{40}H_{56}O_4$ ) es el (3.3-dihidroxi- $\kappa$ - $\kappa$ -caroteno-6-6 diona)

Ø En (ter de petróleo) su  $\lambda_{máx}$  es 442, 468, 502 nm.

Ø En (benceno) su  $\lambda_{máx}$  es 460,486, 522 nm.

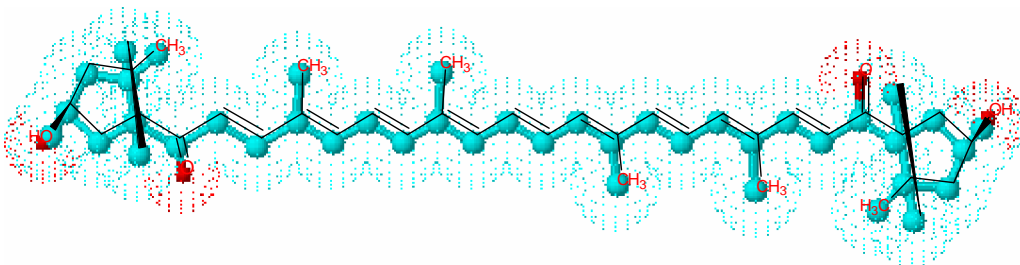


Figura 10: Estructura de la Capsorrubina. (Lock, 1997)

## Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika (*Capsicum annuum*)

Bach. Sandro Bustamante Munives

Bach. Maharani Puccier Luna

### 2.4.- $\beta$ -caroteno

Según (Lock, 1997), el  $\beta$ -caroteno ( $C_{40}H_{56}$ ) es el ( $\beta,\beta$ -caroteno)

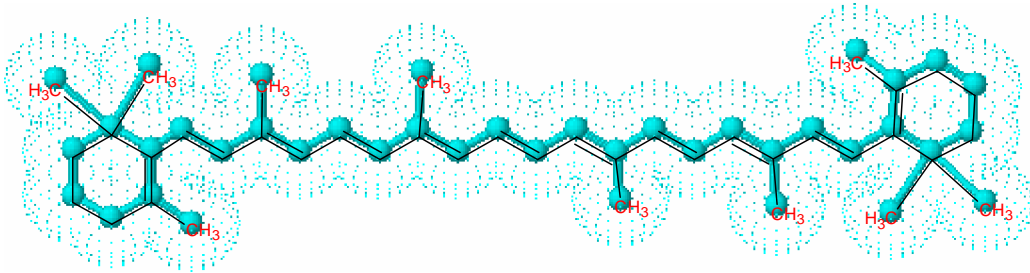


Figura 11: Estructura de  $\beta$ -caroteno. (Lock, 1997)

## 3.- LAS ENZIMAS

### 3.1.- DEFINICIÓN, NATURALEZA

Las enzimas son proteínas desarrolladas por las células vivas de organismos vivos con la función específica de catalizar reacciones químicas.

 Que es catalizar?, Un catalizador, ayuda a que una reacción, se realice en menos tiempo. Esto porque el catalizador disminuye la energía de activación para dicha reacción.

Como todas las proteínas, las enzimas poseen una estructura primaria, secundaria, y terciaria. La estructura primaria esta constituida por la secuencia de aminoácidos unidos por enlace

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

peptídico, mientras la secundaria y terciaria otorgan a la enzima su forma tridimensional.

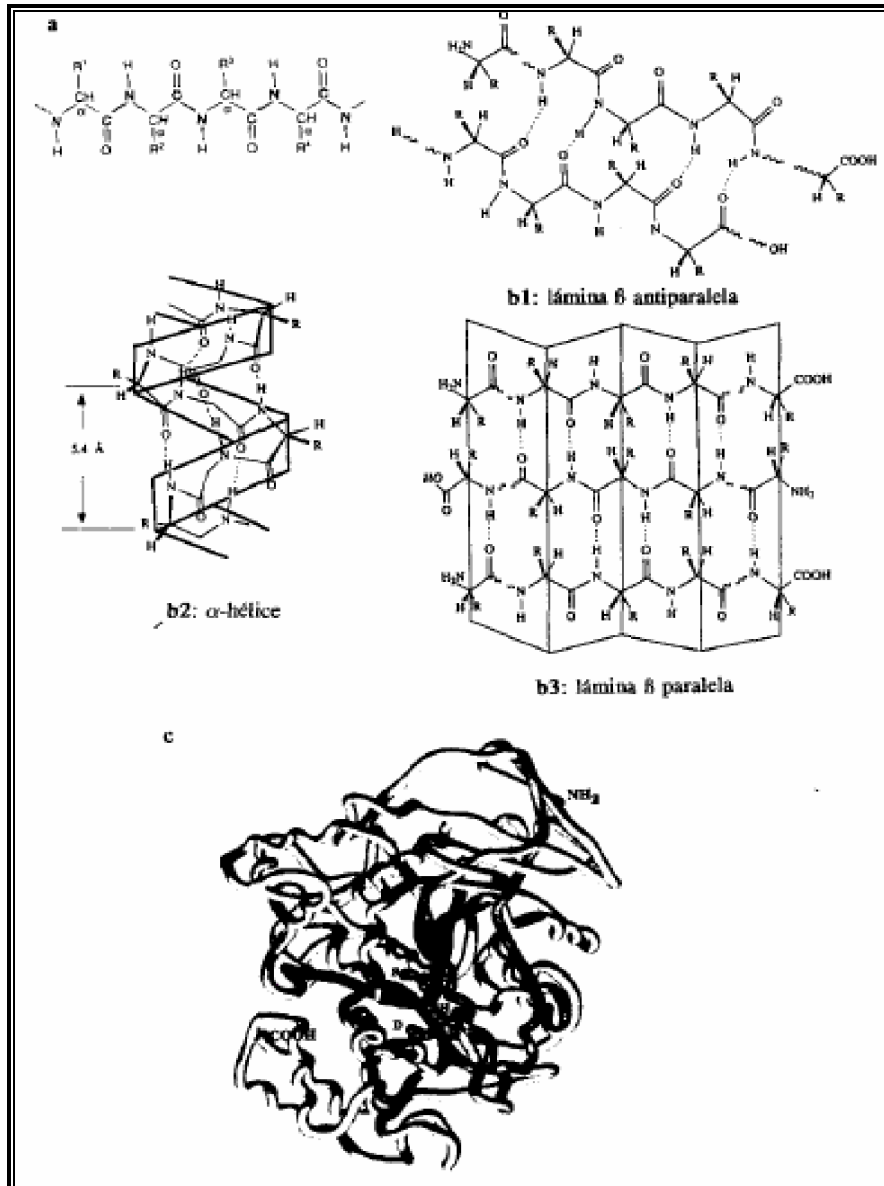


Figura 12. Estructura de las enzimas (a) estructura primaria, (b) estructura secundaria y (c) estructura terciaria (Arroyo, 1995)

Debido a su estructura proteica, las enzimas son muy sensibles a los cambios que se producen en su entorno. La presencia de



**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

disolventes orgánicos, una concentración alta de sales, un pH o una temperatura extrema, puede provocar la desnaturalización de la enzima, es decir, la perdida de las estructuras secundarias y terciarias. Con pequenas variaciones del pH o de la temperatura no se llega a la desnaturalización, pero la enzima pierde actividad al haber cambios en su conformación. En general, la mayoría de las enzimas desarrollan su actividad óptima a pH= 7 y una temperatura de 37 C.

### 3.2.- Propiedades de las Enzimas

Por ser catalizadores:

- √ Eficientes en pequenas cantidades.
- √ No se modifican durante la reacción.
- √ No afectan el equilibrio de la reacción.

Por ser catalizadores biológicos:([Soko, 2007](#))

- √ Composición química específica: son proteínas con estructura terciaria y cuaternaria.
- √ Componentes del citoplasma vivo y sintetizado en el mismo.
- √ Específicas: para cada reacción hay una enzima determinada.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

### 3.3.- COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA DE LAS ENZIMAS

Después que la naturaleza proteica de las enzimas fue aceptada, el camino siguiente fue precisar su composición y estructura. Es así que se emplearon inicialmente tediosos métodos para determinar la secuencia y análisis de aminoácidos como los ensayos microbiológicos y la cromatografía de intercambio iónico; hasta llegar a las modernas máquinas que requieren corto tiempo(1 hora) y una pequeña cantidad de muestra (1 ug). La demostración de la estructura primaria de la cadena  $\beta$  de la insulina fue el inicio de la ingeniería de enzimas. ([Gerhartz, 1990](#) citado por [Salazar F, 1998](#)).

El hecho de que las enzimas son muy especificas en escoger el sustrato, derivado muchos estudios sobre la *Cinética Enzimática* que precisaban la formación de un complejo enzima- sustrato, estas observaciones se pudieron explicar fácilmente por cuanto la conversión del sustrato a producto se produce en un sitio restringido de la molécula de enzima. Este sitio fue inicialmente como "Centro Activo" y comúnmente ahora. "Sitio Activo". El conocimiento del sitio activo y de los compuestos que reaccionan con él ha hecho posible ahora el diseño de inhibidores del sitio activo de la enzima. Los inhibidores del sitio activo adquieren mayor importancia no solo

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

académicamente, sino comercialmente para la utilización racional en la toxicidad selectiva o quimioterapia. ([Lehninger, 1982](#))

### 3.4. MECANISMOS DE ACCIÓN ENZIMÁTICA.

El mecanismo de la acción enzimática no es diferente de los demás procesos catalíticos. En la primera etapa. El sustrato debe combinarse con el catalizador, formándose un complejo enzima-sustrato. Este complejo es inestable bajo las condiciones de la reacción y se descompone, regenerando a la enzima. El sustrato sin embargo emerge de la reacción ya sea en la forma final modificada o en un estado original muy activado. ([Braverman, 1980](#))

En una reacción enzimática hay 3 fases: En la primera que dura solo una fracción de segundo, la concentración de enzima libre disminuye drásticamente, puesto que la mayor parte se combina con el sustrato en un equilibrio dinámico, que persiste mientras haya molécula de sustrato libre. En la segunda fase, todos los reactantes, incluyendo las moléculas de enzimas, estn en equilibrio dinámico y se alcanza la actividad máxima, puesto que la alta concentración de sustrato permite que las moléculas de enzima vuelvan a formar los complejos de enzima-sustrato muy rápidamente, inmediatamente después de haber transformada las moléculas de sustrato previas.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

En la tercera fase de reacción, la concentración de sustrato disminuye apreciablemente, con lo que la velocidad de la reacción catalizada por la enzima decae asintóticamente. Esta fase es importante en muchas reacciones industriales donde se desea que la reacción transcurra completamente y tanto el rendimiento como la concentración del producto obtenido sean máximos, de tal forma que las interacciones entre factores tales como las concentraciones de enzima y sustrato y las condiciones de reacción son de crucial importancia. Esta fase representa frecuentemente la mayor parte del tiempo de reacción, especialmente cuando se produce la inhibición por el producto, hecho muy probable se emplean concentraciones de sustrato altas ([Wiseman, 1986](#)).

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

### 3.5. CINÉTICA ENZIMÁTICA

Se entiende por cinética enzimática, el análisis cuantitativo del efecto de cada uno de los factores que intervienen en la expresión de la actividad enzimática, evaluada a través de la velocidad de la reacción catalizada.

Las variables más importantes en cinética enzimática son el tiempo de hidrólisis, la concentración enzima, de sustrato, la temperatura, pH y el medio de reacción ([Illanes, 1994](#)).

#### A. Tiempo de hidrólisis:

La cantidad de producto formado en una reacción enzimática es proporcional al tiempo de hidrólisis. La reacción es lineal en el tiempo hasta un periodo determinado en que se puede expresar la actividad enzimática en términos de velocidad, o sea la cantidad de producto formado por unidad de tiempo. Generalmente la velocidad se expresa como micromoles de producto formado por minuto. Los valores deben estar comprendidos dentro de la parte proporcional o lineal de la reacción. Después de algún tiempo, la gráfica deja de ser lineal porque las reacciones son generalmente reversibles y tienden al equilibrio. La velocidad puede disminuir por agotamiento del sustrato, por desnaturalización de la enzima después de cierto tiempo o porque los productos de la reacción puedan tener

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

Bach. Sandro Bustamante Munives

Bach. Maharani Puccier Luna

efecto inhibitor sobre la actividad enzimática. (Villavicencio, 1995).

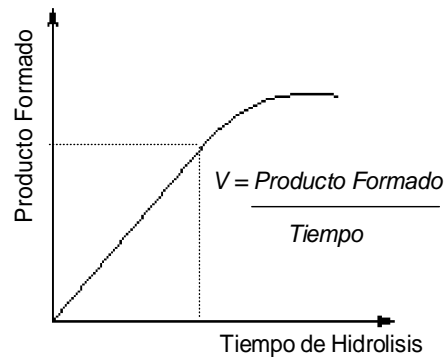


Figura 13. Tiempo de hidrólisis y Actividad Enzimática (Villavicencio, 1995).

**B. Concentración de Enzima**

Cuando el sustrato se encuentra en exceso, a concentraciones saturantes, la velocidad de la reacción es proporcional a la concentración de la enzima. Si se hace un gráfico, se obtiene una recta como se muestra en la figura. (Villavicencio, 1995).

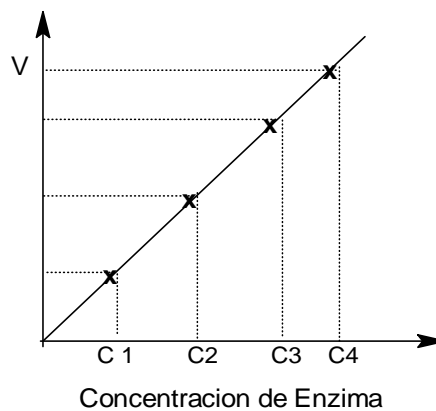


Figura 14. Efecto de la concentración de enzima sobre la velocidad de la reacción enzimática (Villavicencio, 1995).

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

C. Concentraci3n de Sustrato.

Cuando la concentraci3n de la enzima se mantiene constante y se va incrementando la concentraci3n del sustrato, se obtiene una grafica hiperb3lica. Inicialmente, la velocidad de la reacci3n varía proporcionalmente a la concentraci3n del sustrato obteniéndose una línea recta (reacci3n de primer orden). Luego el incremento de la velocidad de reacci3n va disminuyendo al incrementarse la concentraci3n de sustrato, llegando un momento en que no hay más incremento y la velocidad se hace constante.

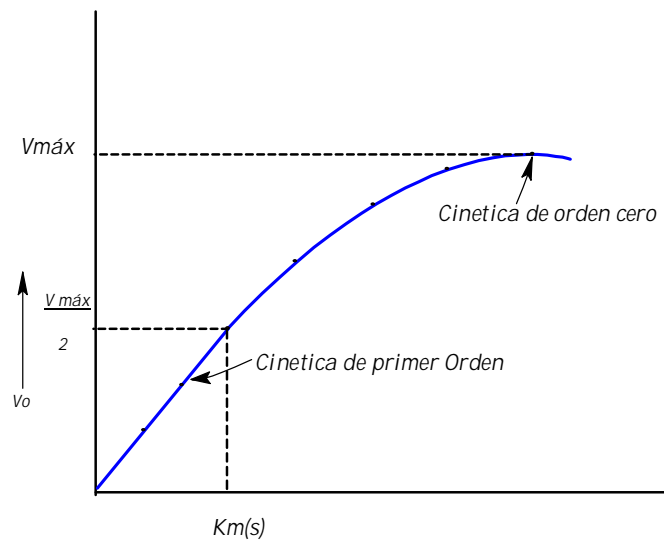


Figura 15. Efecto de la concentraci3n de sustrato sobre la velocidad de la reacci3n enzimática (Villavicencio, 1995).

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

Michaelis y Menten describieron esto como una transición de la velocidad de una fase dependiente de sustrato a otra independiente. Además propusieron que la enzima E se combina reversiblemente con el sustrato S para formar un complejo intermediario enzima-sustrato ES con una constante de velocidad  $K_1$ . El complejo ES tiene dos destinos posibles: puede disociarse en E y S con una constante de velocidad  $K_2$ , o puede formar un producto P, con una constante de velocidad  $K_3$ .



Si la reacción enzima / sustrato es pequena y las concentraciones de sustrato estn comprendidas entre los límites de saturación, la velocidad de reacción inicial ( $v$ ) puede expresarse:

$$v = \frac{V_{\text{máx.}} [\text{S}]}{K_m + [\text{S}]}$$

**D. Efecto del PH**

La mayor parte de las enzimas tienen un pH característico en el cual su actividad es máxima. Este pH se llama pH óptimo. Por encima y por debajo de este pH la actividad declina.

La curva de actividad de las Enzimas con el pH tiene generalmente una forma acampanada.



**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

Cuando los valores de pH son muy ácidos o muy alcalinos, no solo se modifica el sitio activo, sino que se altera la estructura terciaria de toda molécula, pudiendo llegar a la desnaturalización y no habrá actividad enzimática. (Villavicencio, 1995).

**E. Efecto de la Temperatura**

La temperatura es un factor que puede influir considerablemente en la velocidad de la reacción. Los pequeños cambios tienen una influencia considerable. La temperatura óptima para la mayoría de las reacciones est  entre los 30 a 40 . (Schmidt, 1982 citado por Coronel, 2000).

Cuando la temperatura llega a cierto valor variable, según la enzima de que se trate, esta empieza a desnaturalizarse y la velocidad de las reacciones comienza a disminuir. La temperatura óptima es la resultante de dos procesos: el incremento de la velocidad de reacción con la T  y el incremento de la desnaturalización térmica de la enzima por encima de la temperatura crítica. La mayor parte de las enzimas se inactivan a temperaturas superiores a 55 – 60  C. (Villavicencio, 1995).

## Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika (*Capsicum annuum*)

Bach. Sandro Bustamante Munives

Bach. Maharani Puccier Luna

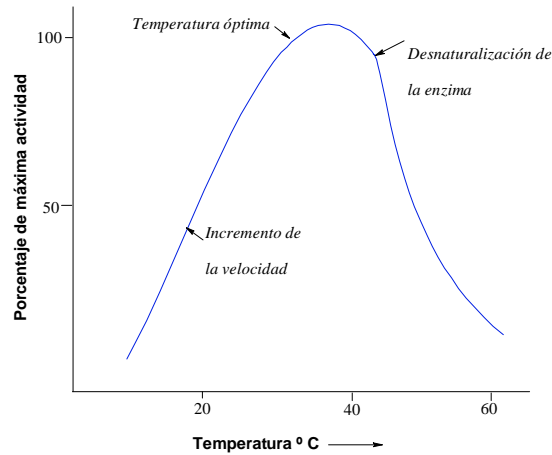


Figura 16. Efecto de la Temperatura sobre la actividad Enzimática (Villavicencio, 1995).

### F. Influencia del medio de reacción

Esta reacción catalítica no sólo se ve afectada claramente por el pH y la temperatura, sino que debe considerarse el efecto que produce la coexistencia de productos químicos en el baño de tratamiento (tensoactivos) o aplicados sobre el sustrato (colorantes).

La especificidad de la catálisis hace que para el caso de las enzimas utilizadas para el tratamiento enzimático, las condiciones óptimas de pH y temperatura sean de 5-6 y 40-50 ° C, respectivamente, variando en función del tipo de enzima comercial utilizado. Por lo tanto, la efectividad y

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

reproducibilidad del tratamiento dependerá enormemente del control de estas dos variables. Por este motivo es recomendable el uso de *soluciones tampón*, que modifican la fuerza iónica del medio, los tampones evaluados en investigaciones tienen que ser de 0.05 M a 0.1 M; pues a concentraciones altas de los iones pueden afectar también la actividad enzimática. (King, 1968)

### 3.6.- Fuentes de las Enzimas

Las enzimas comerciales son producidas por fermentación de cepas de microorganismos no patógenas ni toxigénicas especialmente seleccionadas, que solo a través de cuidadosos procesos de aislamiento y extracción se logra que estas enzimas puedan encontrarse disponibles en el mercado, o son extraídas y purificadas de fuentes vegetales o animales. Típicamente, el preparado de la enzima no contiene el microorganismo que fue utilizado en su producción si no que derivan de ellos. Los productos de enzimas est n disponibles en diversas formas físicas: líquidos, suspensiones, gránulos y polvos.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

### 3.7.- Enzimas Microbianas

El primer paso en la manufactura de una enzima implica la selecci3n de un organismo adecuado que produzca la enzima deseada en cantidades tan grandes como sea posible. ([Wang, 1979](#) citado por [Salazar, 1998](#)).

Las enzimas extracelulares son preferidas, por que la dificultad y costosos métodos de ruptura celular no son necesarios. En contraste a las enzimas intracelulares que pueden encontrarse, luego de la ruptura de la célula, mezclada con los componentes celulares; estas se presentan en forma relativamente pura en el medio de cultivo.

### 3.8.- Hidr3lisis Enzimática

La cuantificaci3n de una determinada enzima presente en un medio es una medida compleja, por lo tanto la parte de la enzima puede ser inactiva, o parcialmente activa, más allá de la posibilidad de la existencia de otras enzimas en el medio mismo. El parámetro más importante que debe ser considerado en la cuantificaci3n de una enzima es su actividad, es decir, la actividad enzimática. Cada fabricante de la enzima define las condiciones experimentales apropiadas de las unidades particularmente. ([Rigon, 2005](#))

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

La hidrólisis enzimática es ampliamente preferida sobre los métodos estrictamente químicos debido a su alta especificidad, por que es predecible y contable. La hidrólisis enzimática es importante en la industria alimentaria por los efectos químicos u organolépticos que producen ([Berrueta et al., 1992 citado por Gálvez, 2005](#)).

Al evaluar un proceso enzimático con un químico se deben considerar muchos factores. Un factor muy significativo es la especificidad de las reacciones enzimáticas, comparadas con las químicas. Otra comparación son listados a continuación.

Cuadro 3: Cuadro de comparación entre Proceso Químico y Enzimático

Proceso Químico	Proceso enzimático
∅ Muy agresivo(fuerte)	∅ Menos agresivo
∅ Subproductos potencialmente inaceptables	∅ Muy pocos subproductos.
∅ Dficult de controlar	∅ Fácil de controlar
∅ Sintético	∅ Es natural
∅ Tiempo corto	∅ Requiere un tiempo + largo
∅ M. prima + barata	∅ M. Prima + costosa
∅ Es tradicional	∅ Es nuevo

Fuente: ([Penet, 1991 citado por Gálvez, 2005](#))

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

### 3.9. Como Seleccionar la Enzima

Al incrementarse el número de aplicaciones y hacerse más especializadas y además existen múltiples enzimas disponibles en el mercado y una gran cantidad de proveedores, el proceso de selección se vuelve complicado, por esto es necesario tomar en cuenta: ([Enzyme Development Corporation, 2007](#)).

- *El tipo de reacción a catalizar:* La mayoría de las enzimas alimentarias son hidrolasas (tales como amilasas, proteasas, lipasas, celulasas, pectinasas, xilanasas, hemicelulasas y otras).
- *Costos:* Analizar el costo de diversos proveedores.
- *Actividad de la enzima:* Las enzimas siempre se venden basándose en su potencia. La actividad/potencia, es la medida que debe conocerse para saber cuanta enzima se necesita para llevar a cabo una reacción específica dentro de un tiempo específico. La actividad enzimática puede no estar definida en las mismas unidades de una empresa a otra. Otro punto importante es que el método de análisis para determinar la actividad de la enzima debe estar disponible en la información que brinda la empresa proveedora.
- *Presentación (Líquida o Sólida):* las enzimas generalmente líquidas son menos estables que los sólidos a pesar de que

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

pueden tener una mayor actividad. En general en la práctica se supone que la pérdida de la actividad de las enzimas líquidas debido a los tratamientos térmicos y mecánicos puede sustancialmente ser minimizada una vez incorporados a los alimentos, ya que su contenido hídrico disminuye. (Ryan, 2000).

### 3.10. Aspectos Técnicos del Trabajo con Enzimas

El éxito del trabajo con enzimas depende del cuidado con que se eviten las condiciones en las cuales son inestables. Las investigaciones deben llevarse a cabo sin pérdidas inútiles de tiempo y lo más conveniente, en general, es guardar las preparaciones en congeladora.

- ♣ Debe evitarse la formación de espuma, ya que la misma es indicador de desnaturalización proteica.
- ♣ Deben tomarse también varias precauciones en lo que se refiere a las condiciones de la reacción:
  - a) Elegir pH y temperatura en las zonas de mayor estabilidad de la enzima
  - b) Llevar a cabo la reacción a temperatura constante.
  - c) Elegir un buffer adecuado para evitar cambios de pH

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

- d) Elegir una cantidad de enzima adecuada para obtener variaciones apropiadas de la magnitud a medir. (Calvo, 2004).

**4.- CELULASAS**

Las celulasas son proteínas derivadas de los procesos naturales de fermentación, capaces de degradar la celulosa. En realidad, una enzima de Celulasa es una mezcla de diversos componentes enzimáticos, formando lo que se denomina un "complejo enzimático", que actúa de forma sinérgica en la degradación de la celulosa. Este complejo enzimático está formado por tres tipos de enzimas: endoglucanasas (EGs) o endocelulasas (3-1,4-D-glucan 4-glucanohidrolasa), celobiohidrolasas (CBHs) o exocelulasas (1,4-(3-D-glucan celobiohidrolasa) y (3-glucosidasa (BGs) o celobiasa (3-D-glucósido glucohidrolasa).

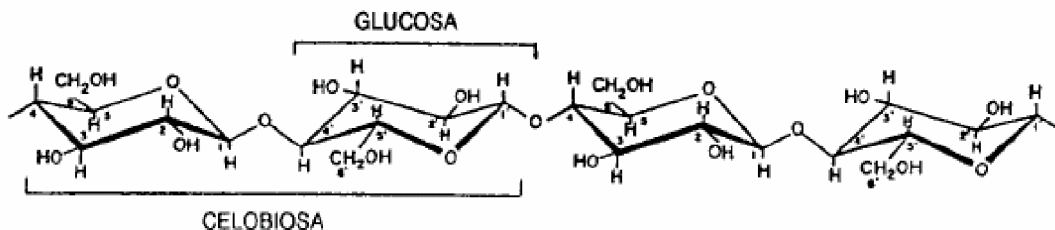


Figura 17. Estructura molecular de la celulosa (Nuero, 1995)

La hidrólisis total de celulosa se lleva a cabo de la siguiente manera las endo-β-1,4-glucanasas (E.C. 3.2.1.4) rompen al azar los



**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

enlaces internos de la molécula en las regiones amorfas, producen un rápido decremento en la longitud de la cadena y un lento incremento de los grupos reductores libres. Las exo- $\beta$ -1,4-glucanasas (E.C. 3.2.1.91) remueven unidades de glucosa o celobiosa a partir del extremo libre no reductor de la cadena de celulosa, dando como resultado un incremento rápido en los azúcares o grupos reductores y poco cambio en el tamaño del polímero. Finalmente la  $\beta$ -glucosidasa (E.C. 3.2.1.21) hidroliza la celobiosa producida por las actividades anteriores, dando como producto final la glucosa

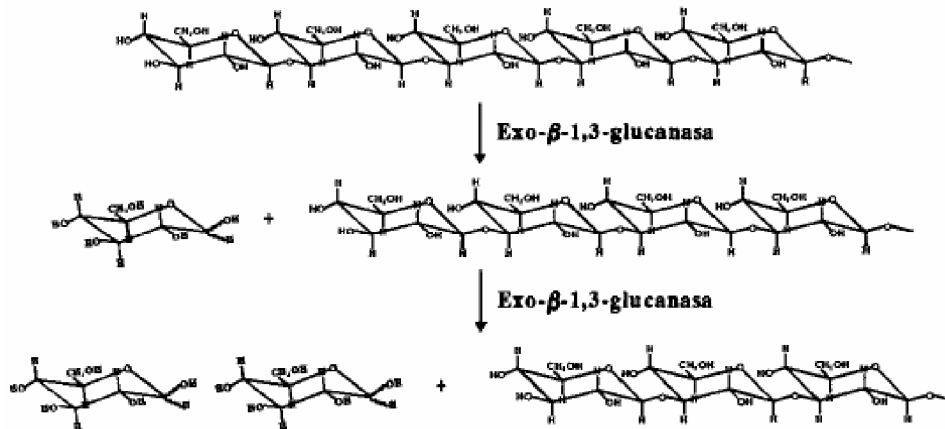


Figura 18: Mecanismos de Acción de una Exoglucanasa  
(Navarrete, 2002)

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

Bach. Sandro Bustamante Munives

Bach. Maharani Puccier Luna

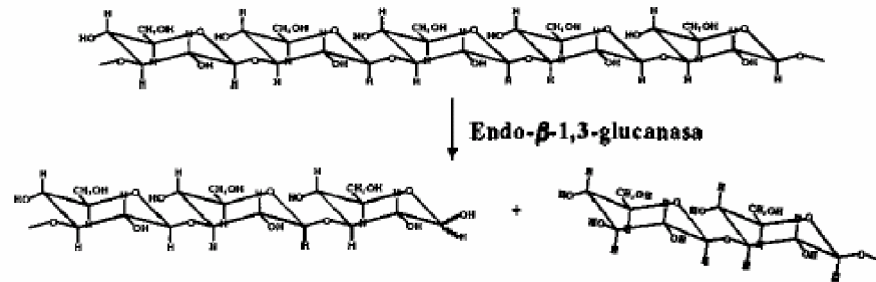


Figura 19. Mecanismos de Acci3n de una Endoglucanasa o Celobiohidrolasas (Navarrete, 2002)

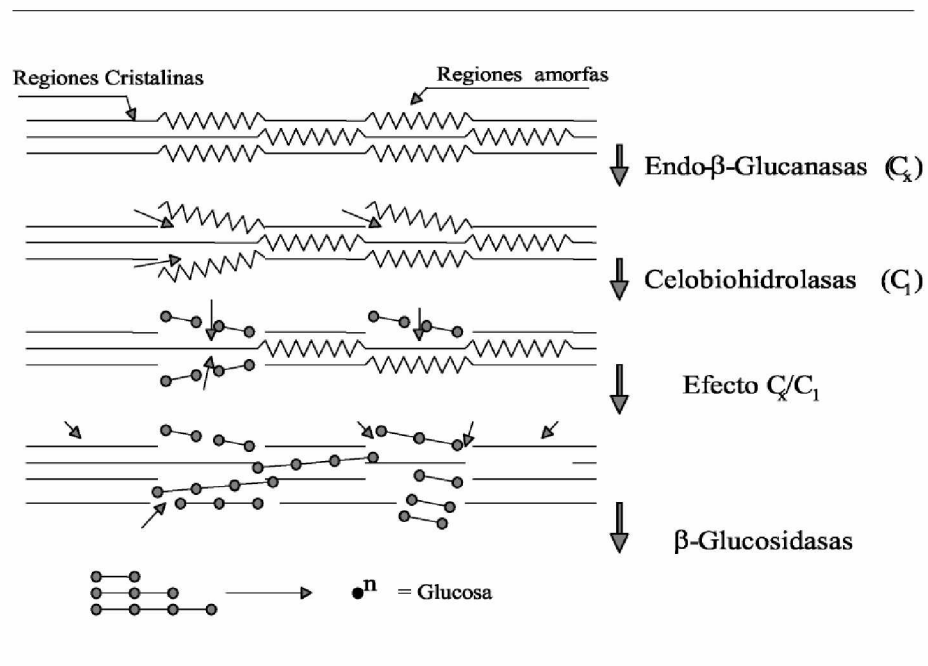


Figura 20. Mecanismo de hidr3lisis enzimática de la celulosa (Navarrete, 2002)

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

Hidrólisis enzimática de celulosa

La hidrólisis enzimática de la celulosa es una reacción catalítica heterogénea, caracterizada por un reactivo insoluble (celulosa) y un catalizador soluble (complejo celulasas); la velocidad de reacción está influenciada tanto por la estructura de la celulosa como por el modo de actuación de la enzima.

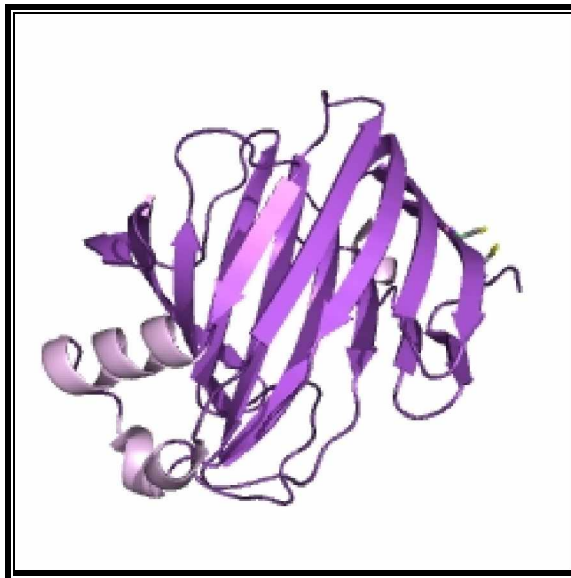


Figura 21: Estructura tridimensional celulasa de *Aspergillus niger*. (PDB, 2006).

Cuadro 4. Nomenclatura de las celulasas

EC 3.-.-.-	Hidrolasa
EC 3.2.-.-	Glicosidasa
EC 3.2.1.-	Glicosido-hidrolasa
EC 3.2.1.4	Celulasa

Fuente: (Enzyme Structures Database, 2003)

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

## 5. PROTEASAS

Las proteasas son enzimas degradativas que catalizan la hidrólisis total de proteínas. También llamadas peptidasas, indicando así que son enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos.

Las proteasa microbianas pueden proceder de tres orígenes distintos: (i) proteasas bacterianas, son muy diversas y abundantes. Aunque son muchas las bacterias capaces de producir proteasas, las más conocidas y estudiadas son las producidas por diferentes especies del genero *Bacillus*. (ii) proteasas producidas por levaduras y hongos. Generalmente son capaces de actuar en un amplio rango de valores de pH (4 a 11) y además actúan sobre una gran diversidad de sustratos, aunque son menos termorresistentes que las proteasas bacterianas. (iii) las proteasas de origen vírico han adquirido mucha importancia en los últimos años debido a que est n involucradas con enfermedades.

Cuadro 5: Nomenclatura de las proteasa

EC 3.-.-.-	Hidrolasa
EC 3.4.-.-	Peptidasa
EC 3.4.21.-	Serina-endopeptidasa
<b>EC 3.4.21.7</b>	<b>Proteasa</b>

Fuente: ([Enzyme Structures Database, 2003](#))

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

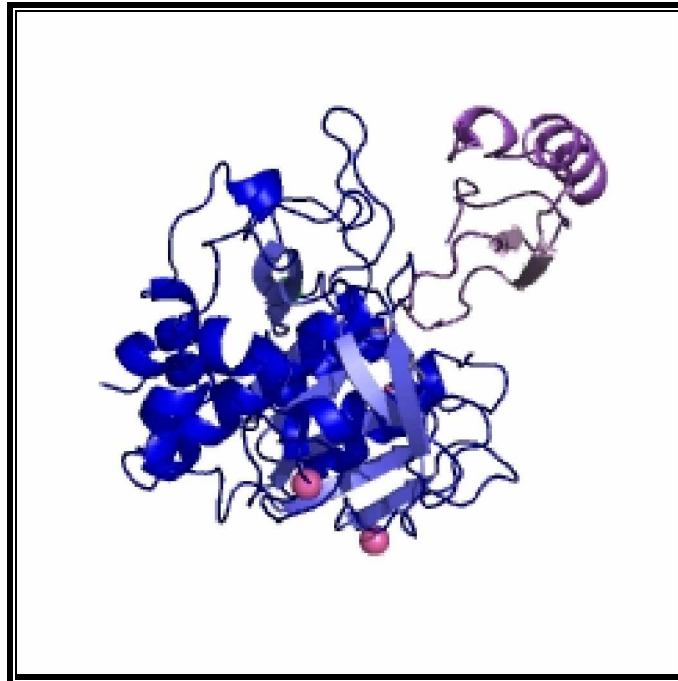


Figura 22: Estructura tridimensional de Proteasa de *Bacillus subtilis* (PDB, 2006).

**Forma de Actuación**

Las proteasas actúan sobre el enlace peptídico, rompiéndolo, y liberando el grupo amino y el grupo carboxilo según la siguiente ecuación:

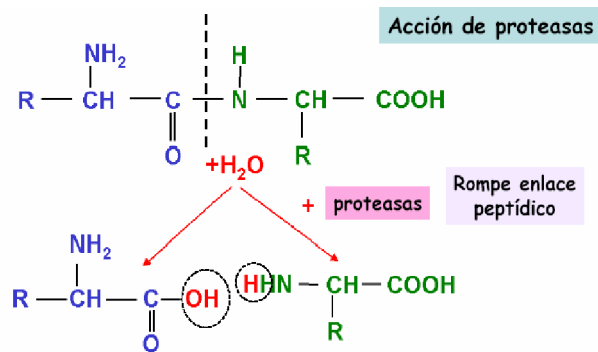
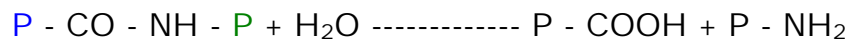


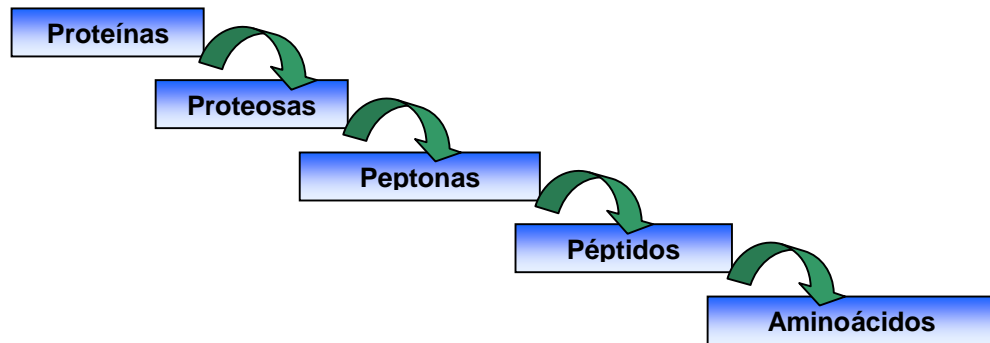
Figura 23. Mecanismos de acción de las Proteasas

## Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika (*Capsicum annuum*)

Bach. Sandro Bustamante Munives

Bach. Maharani Puccier Luna

La hidrólisis enzimática de proteínas es un proceso que transcurre a través de un conjunto de etapas en serie:



### Hidrólisis Proteica

La hidrólisis enzimática de una proteína se utiliza en un gran número de industrias por una amplia variedad de razones incluyendo los cambios en sabor en productos, en la textura y en el aspecto.

Las enzimas proteolíticas son capaces de romper proteínas en péptidos pequeños y en aminoácidos. Las proteasas han sido clasificadas en diferentes formas, por ejemplo en base a su rango de pH en el cual son activos (cidos, neutras, alcalinas) en función a su habilidad de hidrolizar proteínas específicas (keratinas, colagenasas, elastasas, etc.) y por su similitud con enzimas bien caracterizadas (tripsina, quimiotripsina, catepsina, quimosina, etc.). (Bio-cat, 2007).

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

## 6. LIPASA

Dentro de la amplia gama de enzimas hidrolíticas, se encuentran aquellas que catalizan la hidrólisis del enlace éster: las esterasas, Estas enzimas están ampliamente distribuidas en la naturaleza y entre ellas se diferencian en las que hidrolizan ésteres carboxílicos o carboxiesterasas como las *lipasas*, las que hidrolizan ésteres tinicos o tioesterasas como la acetilCoA hidrolasa, y las que hidrolizan monoésteres del ácido fosfórico.

Las lipasas o glicerol éster hidrolasas (EC. 3.1.1.3) han sido diferenciadas de las esterasas principalmente sobre la base de su relativa especificad preferencial. Los sustratos naturales para las lipasas son aceites y grasas, como los triacilgliceridos de ácidos grasos de cadena larga.

El sitio activo de las lipasas posee una triada catalítica compuesta por los aminoácidos Ser-His-Asp/Glu, embebidos en un ambiente de aminoácidos hidrofóbicos primarios y cubiertos por una  $\alpha$ -hélice anflica. Esta característica es común a todas las lipasas. (Nolasco, 2005).

Las lipasas son un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis reversible de triacilgliceridos de grasas animales y aceites vegetales

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

para originar ácidos grasos y glicerol, esta hidrólisis tiene lugar a través de los pasos intermedios de formación diacilgliceridos y monoacilgliceridos. (Arroyo, 1995).

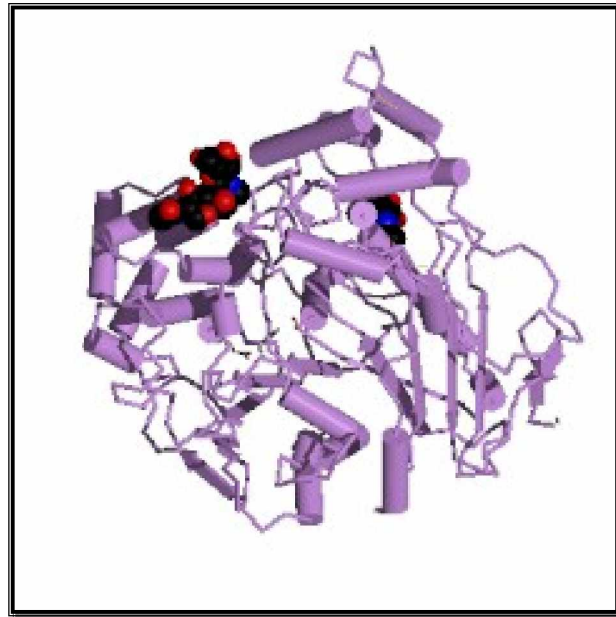


Figura 24: Estructura tridimensional de Lipasa de Candida Rugosa (PDB, 2006).

Cuadro 6: Nomenclatura de las Lipasas

EC 3.-.-.-	Hidrolasa
EC 3.1.-.-	Ester carboxilico
EC 3.1.1.-	Hidrolasa del ester carboxilico
<b>EC 3.1.1.3</b>	<b>Lipasa</b>

Fuente: (Enzyme Structures Database, 2003)



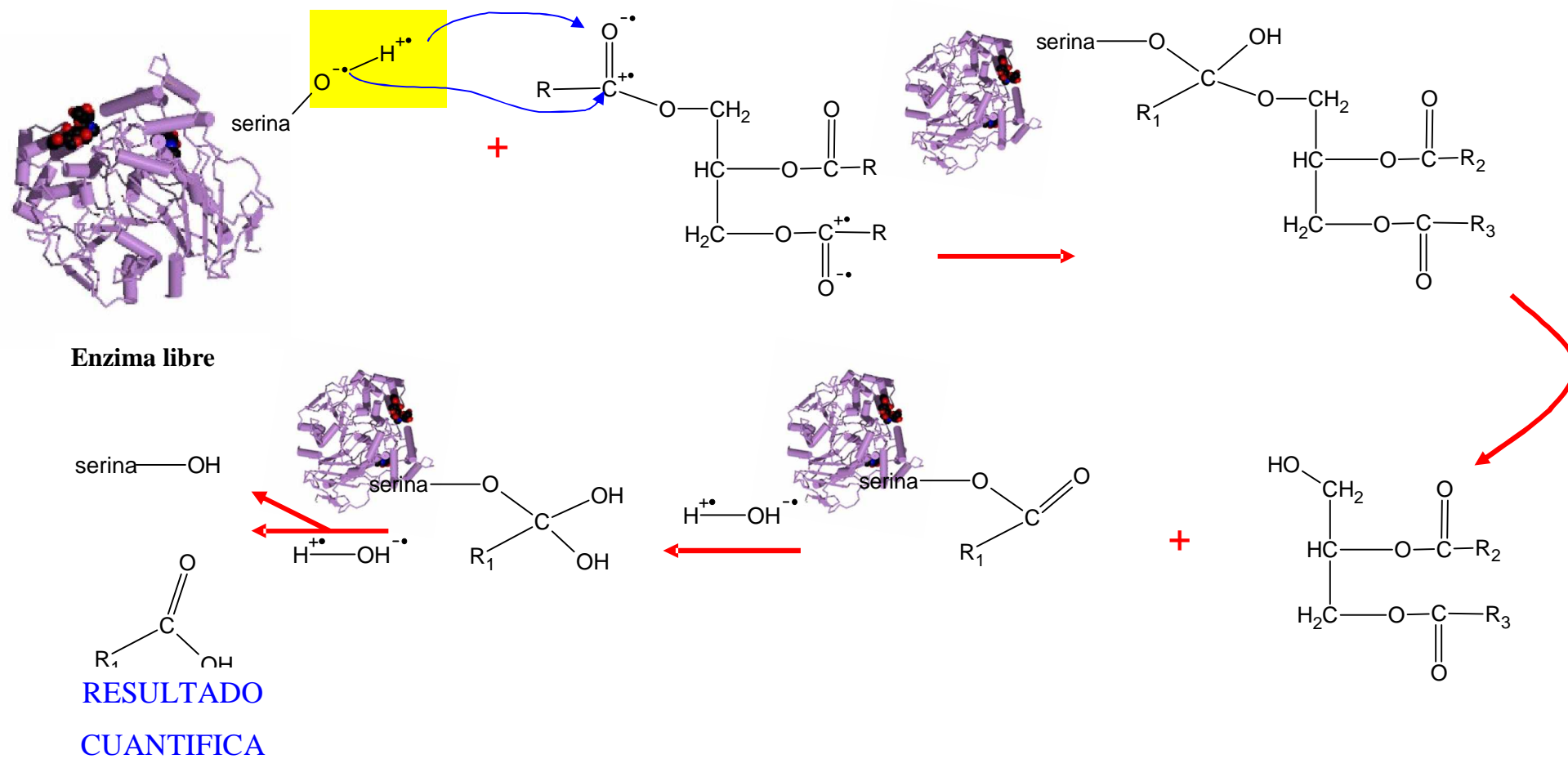


Figura 25. Mecanismos de acción de las lipasas (Sinisterra, 2005).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Materiales, equipos e instrumentos

##### 3.1.1. Materiales

##### 3.1.1.1. Materia Prima

Se empleó Párika (*Capsicum annum*) de la variedad king, proveniente del Fundo San Antonio perteneciente a la corporación Social Agroindustrial Chinecas S. A. Ubicado en la segunda etapa de Bellamar, provincia de Santa del departamento de Ancash.



##### 3.1.1.2. Insumos

Se usaron las siguientes enzimas comerciales:

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

**ENZIMA 1:**


Celulasa producida por *Aspergillus niger*.

La enzima utilizada corresponde a un preparado comercial suministrado por Sigma, comercializado en Perú por la sucursal Química Service. ([www.quimicaservice.com](http://www.quimicaservice.com))



**IDENTIFICACION**

Nombre de Producto	Cellulase from <i>Aspergillus niger</i> Powder, 0.3-1.92 units/mg de solido
Aspecto	Polvo de color amarillento
Sociedad responsable	Sigma-Aldrich
Numero CAS	9012-54-8
Numero de producto	C1184
Clasificación	3.2.1.4
Temp. de Almacenamiento	2-8 C



**COMPONENTES**

Naturaleza química	proteína Enzimática
Denominación	Celulasa
Fuente	Hongo ( <i>Aspergillus niger</i> )
Actividad Celulasa(Units/mg)	One Unit will liberate 1.0 micromole of glucose from cellulose in one hour at pH 5.0 o AT 37 C (2 Hour incubation time)

**CONDICIONES ÓPTIMAS**

pH, Temperatura	5.0, 37 C
-----------------	------------

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

ENZIMA 2:

Proteasa producida por *Bacillus subtilis*



La enzima utilizada corresponde a un preparado comercial suministrado por Bio-cat. (<http://www.bio-cat.com>)

IDENTIFICACIÓN

Nombre de Producto	Neutral Protease.	
Nombre químico	subtilisin	
Aspecto	Polvo de color amarillento.	
Sociedad responsable	Bio-cat Inc.	
Numero CAS	9001-92-7	
Clasificación	3.2.21.7	
Temp. de Almacenamiento	2-8 C	

COMPONENTES

Naturaleza química	proteína Enzimática
Denominación	Proteasa
Fuente	Bacteria ( <i>Bacillus subtilis</i> )
Actividad Proteasa(PC)	One PC unit is defined as that quantify of enzyme that produces the equivalent of 1.5 mg/ml of L-tyrosine per minute the conditions of the assay(pH 7.0, 37C)

CONDICIONES ÓPTIMAS

pH	7.0
Temperatura	37 C

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

ENZIMA 3:

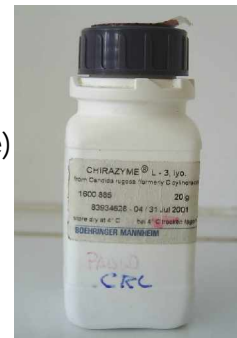


Lipasa producida por *Cándida rugosa*

La enzima utilizada corresponde a un preparado comercial suministrado por la empresa Boehringer Mannheim (Roche)

IDENTIFICACION

Nombre de Producto	Lipasa Triacilglycerol.
Nombre químico	Chirazime�
Aspecto	Polvo de color amarillento
Sociedad responsable	Boehringer Mannheim (Roche)
Numero de producto	C1184
Clasificación	3.1.1.3
Temp. de Almacenamiento	2-8� C



COMPONENTES

Naturaleza química	proteína Enzimática
Denominación	Lipasa
Fuente	Levadura ( <i>Candida rugosa</i> )

CONDICIONES ÓPTIMAS

pH	7.0
Temperatura	37 � C

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

3.1.1.3. Reactivos

- Ø Acetona ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ), *Merck*
- Ø Acetato sodico ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )
- Ø  cido fosforico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), *Merck*
- Ø  cido 3-5 dinitrosacilico ( $\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7$ ), *Sigma*
- Ø  cido Acético ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ ) *L&H Chemical Product.*
- Ø Azul brillante Coomassie G-250
- Ø Etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ), *Induquimica S.R. Ltda..*
- Ø Fenoltaleina ( $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$ ), *Riedel-de Haen*
- Ø Fosfato monopotasico de Potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), *Merck*
- Ø Fosfato dibasico de Potasio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), *Alfa Aesar*
- Ø Hidróxido de sodio, ( $\text{NaOH}$ ), *Mallinckrodt*
- Ø Glucosa anhidra ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ )
- Ø Protein st andar, *Sigma*
- Ø Sal de Rochelle (tartrato de sodio y potasio 4-hidrato)  
( $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ), *Merck*

3.1.1.4. Materiales Metálicos

- Ø Cuchillo
- Ø Cucharas
- Ø Espátula
- Ø Gradilla

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

- Ø Ollas
- Ø Soporte universal
- Ø Varilla

3.1.1.5. Materiales de vidrio y otros

- Ø Matraz ermeleyer
- Ø Vasos de Precipitado de 50, 250, 500 y 1000 ml
- Ø Buretas de 25 ml
- Ø Micropipetas
- Ø Tubos de ensayo
- Ø Embudo de vidrio
- Ø Probetas 100 y 250 ml
- Ø Pipetas de 1, 5, 10 ml.
- Ø Fiolas de 100, 250 y 1000 ml.
- Ø Papel de filtro Whatman N°.1, N° 40
- Ø Tamizador.
- Ø Frascos de color mbar

3.1.2. Equipos e instrumentos

- Ø Agitador de tubos Maxi Mix. Marca: Thermolyne. Modelo: N°M  
37615
- Ø Agitador Rotatorio, Shaker A-85, Marca Biotron, Espana
- Ø Agitador Magnético, Marca Thermolyne, Modelo S1252-26, USA

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

- Ø Balanza Analitica, modelo AA-200, Marca Denver Instruments Company USA.
- Ø Equipo Baño Maria. Marca: Biotron. Modelo: Electronic Thermostat Btr-65
- Ø Espectrofotometro, Marca Spectronic 20D, Milton Roy Company. USA.
- Ø Estufa tipo R-30, Marca Memmert, Alemania.
- Ø Digestor, Velp Científica, Heating digester, (Italy)
- Ø Destilador, Velp Científica, Modelo UDK 126<sup>a</sup>, (Italy)
- Ø Equipo Soxhlet, Kimax 45150, (USA)
- Ø Cocina eléctrica, Selecta, N 187856, (España)
- Ø Refrigeradora, Marca Phillips. Volumen 12 pies<sup>3</sup>
- Ø PH-meter digital, modelo HI 9017K, Marca Hanna Instruments, USA.
- Ø Juego de Tamices, Marca ATM Products.USA Estandar Testing Sieve A.S.T.M E-11 Specification.
- Ø Colorímetro, Chroma Meter (Konica Minolta), Modelo CR-400
- Ø Desecador con silicagel
- Ø Termómetro: inmersión 760 mm, marca Boeco (germany) de 10-25C



**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

### 3.2. METODOS DE ANÁLISIS:

#### 3.2.1. Descripción de la materia prima

La materia prima fue tomada de los frutos frescos (retirados manualmente de sus plantas) tomando en cuenta las recomendaciones para ser recolectadas que son: el color, que las puntas de los frutos est n arrugadas y que el producto muestre la flacidez común, esto se realizo con el fin de no tener variaciones en los datos. Luego se realizó una selección, retirándose los frutos que estuvieran secos y magullados, a continuación se hizo un lavado y se procedió a determinar su índice de madurez y  Brix y luego las siguientes características.

##### 3.2.1.1. Características físicas y Componentes estructurales de la Materia prima.

a) Longitud

Se realizó mediante el empleo de un vernier.

b) Diámetro

Se realizó mediante el empleo de un vernier.

c) Peso

Se determinó mediante el uso de una balanza analítica.

d) Porcentajes de los Componentes estructurales, en base a una cantidad de muestra representativa de materia prima.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

3.2.1.2. Analisis Proximal

- ∅ Determinacion de Humedad, mediante el metodo AOAC.
- ∅ Determinacion de Proteina, mediante el metodo AOAC.
- ∅ Determinacion de Carbohidratos, mediante el metodo AOAC.
- ∅ Determinacion de Grasa, mediante el metodo AOAC.
- ∅ Determinacion de Fibra, mediante el metodo AOAC.
- ∅ Determinacion de Ceniza, mediante el metodo AOAC.

3.2.2. Analisis de Color en el Paprika

3.2.2.1. Determinacion de Grados ASTA,

Metodo ([ASTA 20-1](#)) American Spice Trade Association.

Procedimientos:

- ∅ Se peso una muestra de paprika en polvo de 0.025 gr. y se llevo a un matraz volumetrico de 100 ml. con 25 ml. de acetona, luego se agito durante 15 minutos y se deajo en reposo durante 4 horas a temperatura ambiente y en la oscuridad, Se filtro el liquido con la ayuda de un papel filtro, al filtrado se le realizo una dilucion de 1/10 para poder tomar la lectura llevando una fraccion de esta dilucion a la celda del espectrofotometro y se

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

evalúa la absorbancia a 460 nm., utilizando acetona como blanco.

$$\text{Grados ASTA} = \frac{\text{Absorbancia del extracto} \times 0.164 \times I_f}{\frac{W \text{ muestra gr.}}{25 \text{ ml. de acetona}} \times \frac{1}{10 \text{ ml. de la dilución}}}$$

0.164 = Constante del Método

$I_f$  = Factor de corrección instrumental

$I_f = 0.6 / A_s$

$A_s$  = Solución estándar de color: 0.30005 g/l de dicromato de potasio, más 34.96 g/l de cristales de sulfato de amonio y cobalto en una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.8 M. La Absorbancia de esta solución se llevo a una celda de 1 cm. a 460 nm. el valor de esta solución es de 0.600.

3.2.2.2. Método Colorimétrico:

Se tomo una cantidad de muestra suficiente para llenar el volumen del plato accesorio del colorímetro, las medidas se realizaron con un colorímetro, Chroma Meter (Konica Minolta) modelo CR-400, el cual determina los valores en coordenadas CIE(L\*a\*b), mediante el software OnColor.

## Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika (*Capsicum annuum*)

Bach. Sandro Bustamante Munives

Bach. Maharani Puccier Luna

El procedimiento que se debe seguir para realizar la medida es la siguiente:

1. Tomar el colorímetro y borrar los datos de medidas anteriores.
2. Calibrar el instrumento. Para ello es necesario colocar el cabezal de medida sobre el plato de calibración e invocar a la función "Calibrate" hasta que el aparato indique que esta preparado.
3. Poner al sistema en modo medida apretando el botón "measure".
4. Realizar la medida sobre la superficie de la muestra a medir.
5. Anotar los valores de los parámetros  $L^*a^*b^*$ .

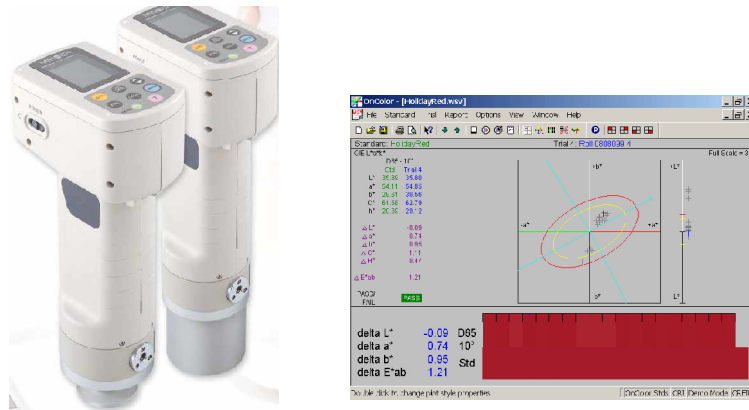


Figura 26: Imagen del colorímetro Chroma Meter (Konica Minolta) modelo CR-400, del software Oncolor.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

### 3.2.3. Analisis con las Enzimas

#### 3.2.3.1. Determinacion de Proteinas (Metodo Bradford)

El principio de la metodología se basa en la union directa del colorante azul brillante de Coomassie G-250, con la enzima (estructura terciaria de las proteinas y aminoacidos específicos), lo que produce un incremento en la absorbancia en relacion directa con la concentracion.

#### Preparacion del reactivo Bradford:

∅ Se disuelve 100 mg. de Azul Brillante Coomassie G-250 en 50 mL de etanol (95 % de pureza) "agitando continuamente para evitar la formacion de grumos". A esta disolucion se le anadiron 100 mL de acido fosforico (85 % w/v). La solucion resultante se diluyo hasta un volumen final de 1 litro, con agua destilada.

#### Procedimiento:

∅ Consiste en preparar una disolucion madre de la enzima a analizar con el buffer fosfato 0.05 M, pH: 7.0 a una concentracion de 0,1 (mg/ml). Luego en un tubo de ensayo se tomo 0.5 ml. de la disolucion madre y se anadio 5 ml. del reactivo Bradford, se llevo a un agitador de tubos. Luego se dejo reposar por 5 min. Para realizar la lectura en el espectofometro a 595 nm.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

Curva de Calibración:

  Se prepararon una disolución madre de Prote n estándar a una concentración de 0.1 (mg/ml) con Buffer fosfato 0.05 M, pH: 7.0, de esta disolución madre se prepararon disoluciones de concentración conocida de 100, 80, 60, 50, 30, 20 (mg. L<sup>-1</sup>) de proteína, utilizando como disolvente Buffer fosfato 0.05 M, pH: 7.0. Luego se siguió el procedimiento descrito anteriormente.

3.2.3.2. Determinación de Azucares Reductores

El principio de la metodología se fundamenta en la reacción del 3,5 dinitrosalicílico que actúa como agente oxidante a la presencia del grupo reductor (aldehído) del azúcar, en un medio alcalino (NaOH), que aporta el medio para que se produzca la reacción redox y el tartrato de sodio-potasio impide la disolución del oxígeno en la reacción. Por lo tanto el 3,5 dinitrosalicílico que actúa como agente oxidante pasa a reducirse en acido 3-amino, 5-nitrosalicílico y el azúcar que tiene una agente reductor se oxida por el lado del aldehído cambiando a grupo carboxílico. ([Navarrete, 2002](#)).

La reacción resulta en la formación de un compuesto coloreado (marrón) según la Ley de Lambert y Beer, la intensidad de este color es proporcional a la concentración de azucares presentes.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

Preparación del Reactivo cido dinitrosalicilico (DNS) :

∅ Colocar en un vaso de precipitado aproximadamente 30 ml. De agua destilada, Posteriormente se adiciona 1.0 gr. de ácido dinitrosalicilico y se procede a agitar con una varilla de vidrio, agregue poco a poco NaOH, 0.4 M (1.6 gr. NaOH/20 ml. de agua destilada), se calienta la solución a 50° C y se agita constantemente, anadindose lentamente 30 gr. de tartrato de sodio y potasio, se agita hasta su total disolución, finalmente se traspasa el contenido a una fiola de 100 ml. y se afora con agua destilada. La solución obtenida puede utilizarse durante 2 meses si se guarda en la oscuridad o cubriéndose con papel de aluminio y dejándose a T° ambiente.

Procedimiento

∅ El ensayo se realizo empleando (0.1 ml de muestra + 1.9 ml de agua destilada), de esta solución se toma 0.3 ml y se le anade 0.6 ml de agua destilada, a esta solución se le anade 1.8 ml. del reactivo DNS, se lleva a ebullición por 5 minutos; se enfría rápidamente en agua helada se adiciona 12 ml de agua destilada se agita los tubos y se deja reposar por 15 minutos. La lectura de absorbancia se realizo en el espectofometro a 540 nm con un blanco de (0.9 ml de agua destilada + 1.8 ml del reactivo DNS) y siguiéndose todos los pasos anteriores a partir de la ebullición.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

Curva de Calibración:

∅ La curva de calibrado se determino a partir de una solución estándar de anhidro-glucosa (10 gr/lt) = (1gr/100 ml) en agua destilada, luego se prepararon soluciones concentraciones conocidas de 2, 3.5, 5, 6.7(mg/ml), concentraciones tomadas de la bibliografía de esta concentraciones se tomaron 0.5 ml y se anadi 1.0 ml de agua destilada, luego se agrego 3 ml de reactivo DNS, se llevo a ebullición y se enfri, se adicione 20 ml, de agua destilada, se agito y se deajo reposar, para su lectura a 540 nm. ([Adney, 1996](#)).

3.2.3.3. Determinación del Rango de Linealidad

La cantidad de producto formado en una reacción enzimática es proporcional al tiempo de hidrólisis. La reacción es lineal en el tiempo hasta un periodo determinado en que se puede expresar la actividad enzimática en términos de velocidad o sea la cantidad de producto formado por unidad de tiempo.

Los valores deben estar comprendidos dentro de la parte proporcional o lineal de la reacción.



**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

Procedimiento:

∅ Se realizó con la enzima que tuviera mayor efecto en la concentración del colorante de páprika, para ello se realizo pruebas a diferentes concentraciones de enzima 0.1%, 0.25%, 0.5%, 1% con respecto al páprika troceado en base seca, tomándose como muestra 1 ml cada 5 min. (análisis por triplicado) graficándose la cantidad de producto formado por unidad de tiempo para cada concentración analizada.

3.2.3.4. Determinación de la Actividad Enzimática

Una forma de expresar la cantidad de enzima presente en una muestra es en términos de su actividad, expresada en unidades de actividad enzimática.

*Unidad Enzimática (U)* = cantidad de enzima que cataliza la transformación de un micromol de substrato por minuto.

$$U = \mu\text{mol}/\text{min}$$

Procedimiento:

∅ Con la concentración de enzima que presentó mayor formación de producto en un menor tiempo, se procedió a calcular su actividad enzimática, tomándose como datos la cantidad de producto formado y el tiempo, en el punto donde la grafica deja de ser lineal reportándose los datos en ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ).

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

3.2.3.5. Determinación de los Parámetros Cinéticos

La determinación de los parámetros cinéticos permiten la calcular los parámetros de diseño y operaciones de reactores enzimáticos y la forma usual de determinarlos es a través de mediciones de velocidad inicial de reacción a diferentes concentraciones de aquellas sustancias que la afectan. La manera más adecuada de obtenerlos es por linealización de las ecuaciones cinéticas. Los métodos más empleados aparecen en la cuadro 7, para un método cinético simple.



Ecuación Fundamental de un método cinético simple

Ecuación de Michaelis –Menten

$$V = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S}$$

**Cuadro 7:** Métodos de Linealización para determinar Parámetros Cinéticos

Método	Eje y	Eje x	Intercep Eje y	Intercep Eje x	pendiente
Lineweaver-	1/v	1/s	1/Vm�x	-1/Km	Km/
Burke	s/v	S	km/ Vm�x	-Km	Vm�x
Hanes	v	v/s	Vm�x	Vm�x/Km	1/ Vm�x
Eadie-Hofstee	t <sup>-1</sup> (ln	(Si-S)/t	Vm�x/Km	Vm�x	-Km
Integrado	Si/S)				-1/Km

Fuente: (Illanes, 1994)

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

A través de la medición de interceptos o pendientes de las rectas resultantes es posible evaluar los parámetros  $V_{máx}$  y  $K_m$ , como se indica en la figura 27.

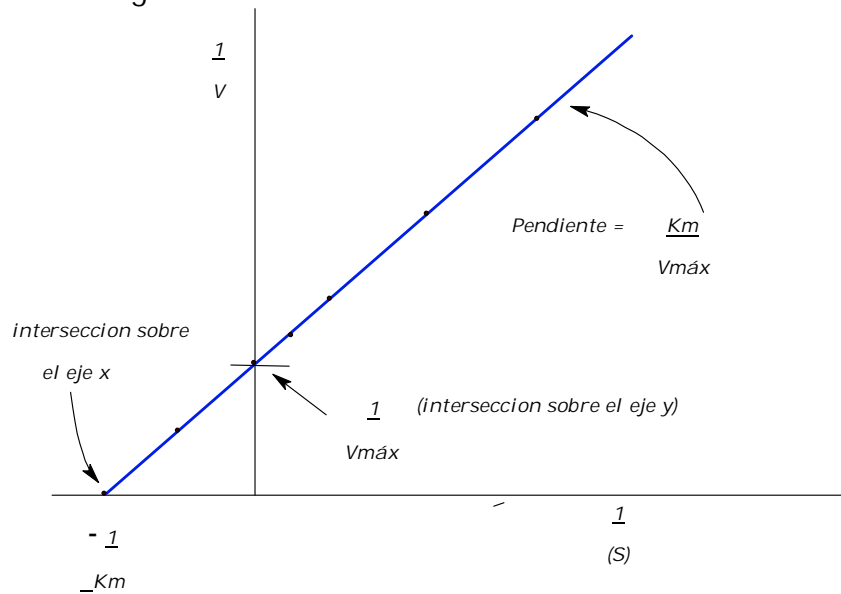


Figura 27: Gráfica de las dobles recíprocas de Lineweaver y Burk que modifica la ecuación de Michaelis-Menten. (Villavicencio, 1995)

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{máx}[S]} + \frac{1}{V_{máx}}$$

Ecuación de Lineweaver-Burk

Esta última ecuación, llamada de los dobles recíprocos, tiene la misma forma que la ecuación de una línea recta ( $y = ax + b$ ) donde

$$y = 1/v$$

$$x = 1/[S]$$

$$a = \frac{K_m}{V_{máx}}$$

$$b = \frac{1}{V_{máx}}$$

La pendiente de la curva

La ordenada en el origen

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

Además se sabe que la velocidad de desaparición del sustrato es igual a la velocidad de formación de producto en el tiempo.

$$-\frac{dS}{dt} = v = \frac{V_{ap} \cdot [S]}{K_{ap} + [S]}$$

De la integración se obtiene la siguiente ecuación.

$$\frac{1}{t} \ln \frac{S}{S_0} = \frac{S - S_0}{t} \frac{1}{K_{ap}} + \frac{V_{ap}}{K_{ap}}$$

$$\underbrace{\frac{1}{t} \ln \frac{S}{S_0}}_y = \underbrace{\frac{S - S_0}{t} \frac{1}{K_{ap}}}_{ax} + \underbrace{\frac{V_{ap}}{K_{ap}}}_b$$

$$a = 1/K_{ap}$$

$$y = (1/t) \ln(S/S_0)$$

$$b = V_{ap}/K_{ap}$$

$$x = ((S - S_0)/t)$$

### 3.2.3.6. Elección de la Variedad de Pprika

Se realizo este análisis para seleccionar entre las variedades más comerciales de Pprika (Queen, Sonora, King), la que tuviera mayor concentración de colorante, en el Pprika en polvo, para ello se realizo la medida del parámetro de calidad comercial en el páprika que es la determinación de grados Asta.

Las tres variedades estudiadas fueron provenientes de los valles de vinzos del Departamento de Ancash debido a que en este

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

lugar se pudo encontrar cosechas de las tres variedades y así evitar variaciones en los datos. Las muestras representativas de cada variedad fueron recolectadas manualmente, llevadas al laboratorio, seleccionadas, lavadas, cortadas, se procedió a retirar semillas y pedúnculos, luego fueron troceadas en tamaños de 5 cm. de largo por 3 cm. de ancho (para todas las muestras), y fueron llevadas a secar en la estufa a 60 C, durante 3 días hasta llegar a peso constante. Luego se deajo enfriar y se llevo a moler, tamizndose las muestras a 0.250 mm. Para finalmente ser almacenadas para su posterior análisis

Al final del ensayo se seleccionó la variedad que tiene mayor concentración de colorante en el páprika. Medidas en grados Asta.

3.2.3.7. Influencia de la forma a utilizar del páprika en la Hidrólisis enzimática (Pprika Troceado o en polvo).

El objetivo de esta prueba preliminar fue determinar la forma a utilizar del Pprika que tuviera mayor efecto en la concentración de colorante. Para ello se realizo una comparación entre el efecto individual del Pprika Troceado y Pprika en polvo, ambos en las mismas condiciones de hidrólisis, frente al efecto individual de las enzimas: lipasa, proteasa, celulasa, y sin enzima.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

a).- Pprika Troceado

La hidrólisis Enzimática se realizó sobre el páprika troceado (tamaño de Troceado: 1 cm<sup>2</sup>), porque a tamaños mayores, existe una menor difusión del sustrato a la enzima, y bajo las condiciones recomendadas por los fabricantes de las enzimas (T, pH), antes de agregar la enzima se acondicionó el Pprika con el Buffer a la temperatura adecuada de la enzima por 15 min. Las condiciones bajo las cuales se realizo el ensayo fueron las siguientes:

- ∅ Concentración de enzima: 0.25 % del peso del Pprika (en base seca).
- ∅ Dilución: Proporción Pprika: Buffer: 1:10
- ∅ Agitación: constante (120 rpm).
- ∅ Variable: Lipasa, Proteasa, Celulasa, s/enzima.
- ∅ Temperatura: ptima recomendada por el proveedor (Sigma, Bio-cat, Roche), para cada enzima.
- ∅ pH: ptima recomendada por el proveedor (Sigma, Bio-cat, Roche), para cada enzima.
- ∅ Tiempo: 2 horas

Al final de la hidrólisis se procedió a la desactivación enzimática, luego se filtro y se llevo a secar en la estufa, para luego ser molido y Tamizado (0.250 mm) y su posterior análisis de Grados Asta.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

b).- Pprika en Polvo

La hidrólisis Enzimática se realizó sobre el páprika en Polvo (tamaño de partícula: 0.250 mm), y bajo las condiciones recomendadas por los fabricantes de las enzimas, Antes de agregar la enzima se acondicionó el Pprika con el Buffer a la temperatura adecuada de la enzima por 15 min. Las condiciones bajo las cuales se realizo el ensayo fueron las siguientes:

- Ø Concentración de enzima: 0.25 % del peso del Pprika (en base seca.
- Ø Dilución: Proporcn Pprika: Buffer: 1:10
- Ø Agitación: constante (120 rpm).
- Ø Variable: Lipasa, Proteasa, Celulasa, s/enzima.
- Ø Temperatura: ptima recomendada por el proveedor ([Sigma](#), [Bio-cat](#), [Roche](#)), para cada enzima.
- Ø pH: ptima recomendada por el proveedor ([Sigma](#), [Bio-cat](#), [Roche](#)), para cada enzima.
- Ø Tiempo: 2 horas

Al final de la hidrólisis se procedió a la desactivación enzimática, luego se filtro y se llevo a secar en la estufa, para luego ser molido y Tamizado (0.250 mm) y su posterior análisis de Grados Asta.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

**3.3. Metodología Experimental:**

La figura 28, muestra esquematicamente las operaciones que intervienen en el proceso de Obtencion Enzimatica de colorante natural a partir de páprika.

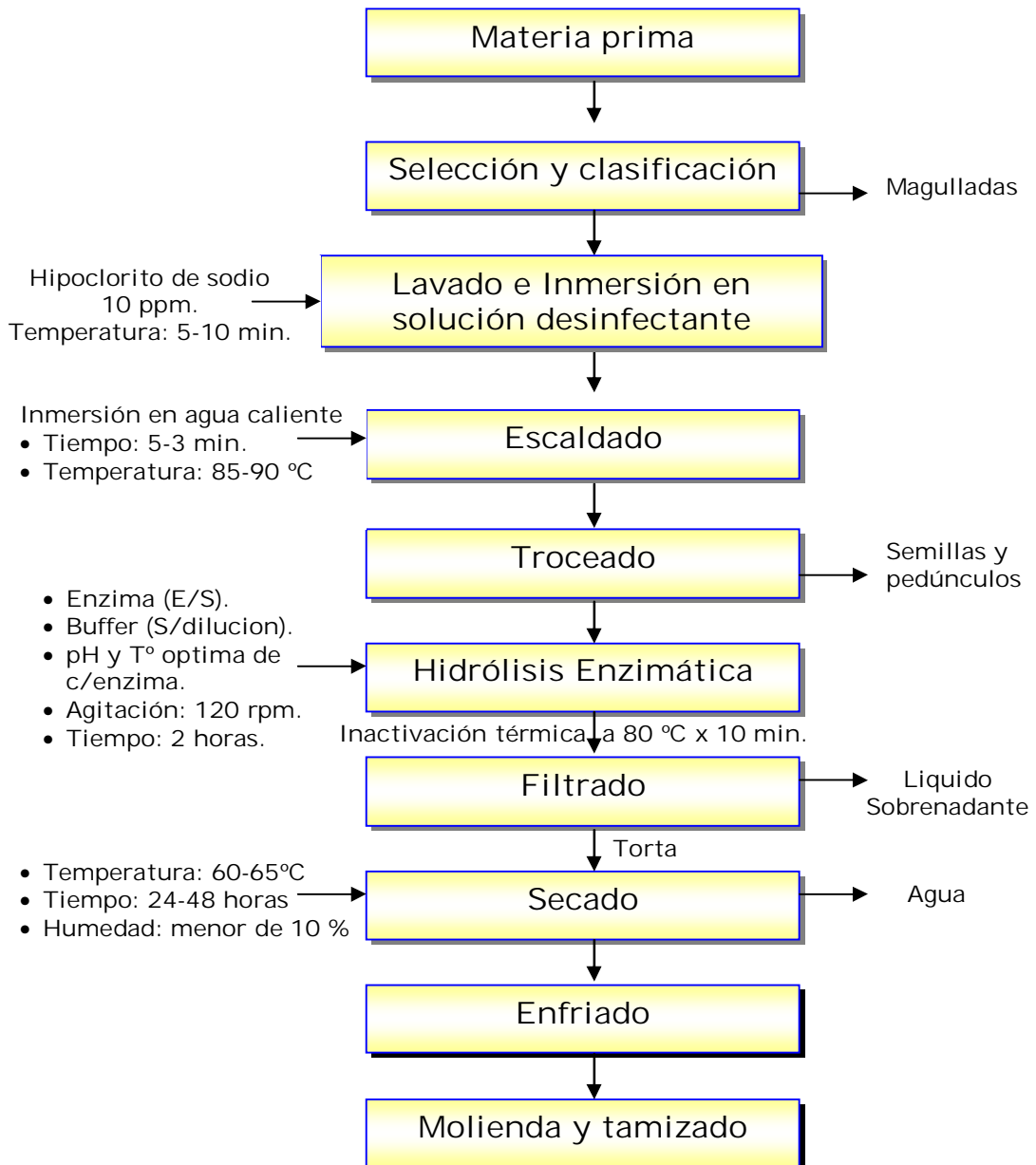


Figura.28: Diagrama de flujo para el proceso general de obtencion Enzimatica de colorante natural a partir de páprika.



**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

a) Materia prima: Se empleo páprika (*Capsicum annuum*), de la variedad que tuviera mayor concentración de colorante medido en grados ASTA.



**Figura 29:** Fotografía del páprika

b) Selección y Clasificación: se realizo visualmente, según su estado físico, descartándose las magulladas o en mal estado, así como las secas, para garantizar la calidad del producto. La clasificación nos permitió tener productos uniformes en tamaño, color, grado de madurez. Esta operación se realizara manualmente.



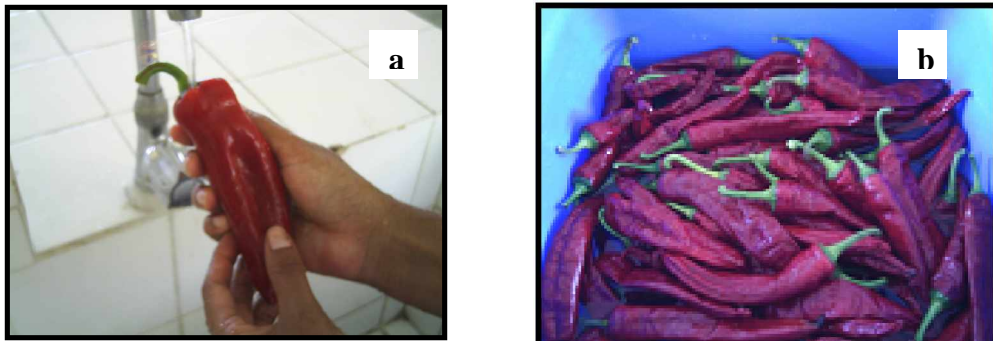
**Figura 30:** Fotografía del páprika seleccionado

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

c) Lavado e Inmersión en solución desinfectante: El lavado de las hortalizas se realizo con agua potable, luego se colocaron las hortalizas en una bandeja con agua clorada (agua con hipoclorito de sodio) 10 ppm, durante 5-10 min. Con el objetivo de reducir la carga microbiana de la materia prima, luego se procede a enjuagar con abundante agua potable.



**Figura 31:** Fotografía del (a) páprika lavado, (b) inmersión en solución desinfectante.

d) Escaldado: se realizo por inmersión en agua caliente a 85-90  C, por un tiempo de 5-3 min., con esta operación se logra inactivar enzimas naturales, eliminar gases intercelulares, fijar el color y aumentar la permeabilidad de las paredes celulares; así como también destruye algunos microorganismos.



**Figura 32:** Fotografía del páprika por inmersión en agua caliente

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

e) Cortado o troceado: las semillas y pedúnculos se eliminaron mecánicamente con cuchillos, luego se cortaron en trozos pequeños para obtener una mayor área de exposición del producto en la etapa de hidrólisis. De un tamaño promedio de 1cm<sup>2</sup>.



**Figura 33:** Fotografía del páprika troceado

f) Hidrólisis Enzimática

Los Tratamientos de Hidrólisis Enzimática sobre el páprika troceado se han realizado en las condiciones óptimas de trabajo (pH, T °) de las diferentes enzimas analizadas recomendadas por el proveedor, para ello se utilizo un vaso de precipitado de 1000 ml., que fungió como reactor, sumergido en un baño maría para regular la T °, colocando este equipo sobre una agitador magnético, que mediante la barra magnética permitía dar una agitación constante, para regular el pH se utilizo un Buffer, que además sirvio como medio para que se lleve a cabo la hidrólisis, tomándose como parámetros iniciales: enzima (una concentración de 0.5 % del peso seco del páprika) y una relación (páprika: Buffer de 1:10). Ajustándose el pH óptimo recomendado por

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

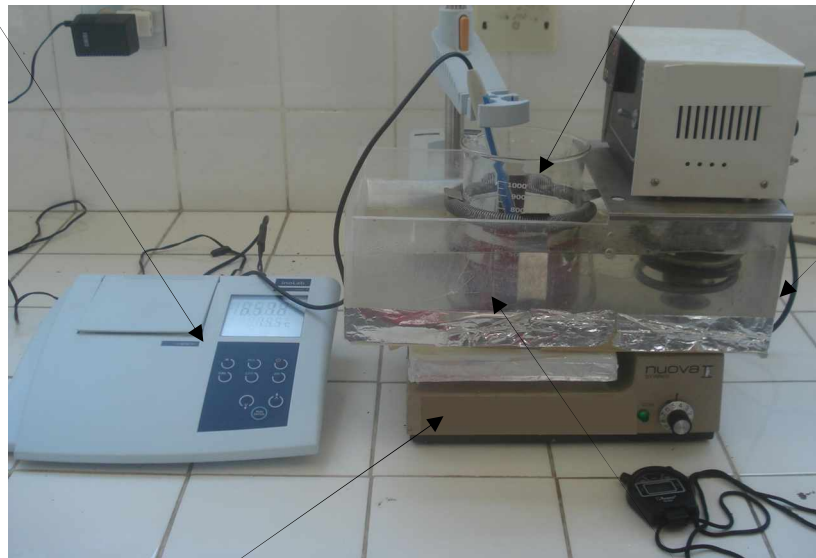
*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

el proveedor (Bio-cat, Sigma, Roche), en función al tipo de enzima:  
pH: 7.0 para Proteasa, pH: 5.0 para Celulasa, pH: 7.0 para Lipasa;  
estos tratamientos fueron llevados a cabo por un tiempo de 2 horas.  
Finalizada la hidrólisis, se desactivo la enzima por aumento de T a  
80  C durante 10 minutos.

pH-metro

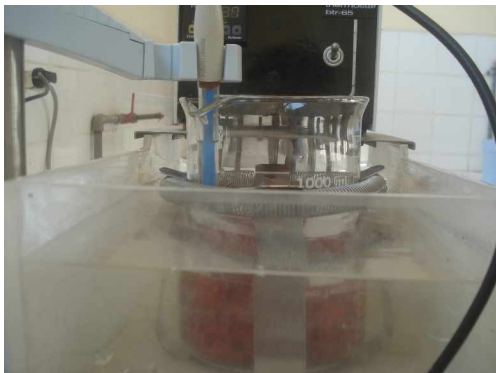
Reactor



Baño Maria

Agitador Magnético

Barra magnética



**Figura 34:** Fotografías del reactor-enzimático y de sus accesorios, en diferentes vistas

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

g) Filtrado: Luego de la desactivación Enzimática el páprika fue sometido a una filtración utilizando una tela, descartándose el líquido sobrenadante, separando los trozos, para su posterior deshidratado



**Figura 35:** Fotografía del liquido sobrenadante filtrado.

h) Secado: Se realizo en una estufa, colocándose los trozos en las bandejas de la estufa, controlándose la temperatura entre 60-65 ° C, debido a que temperaturas superiores a 80 ° C causan perdida de color. Por 2 días, hasta una humedad menor del 10 %, porque esta es la humedad del páprika en polvo.



**Figura 36:** Fotografías del (a) Pprika troceado luego de a hidrólisis Enzimática  
(b) Pprika troceado colocado en la bandejas del estufa.

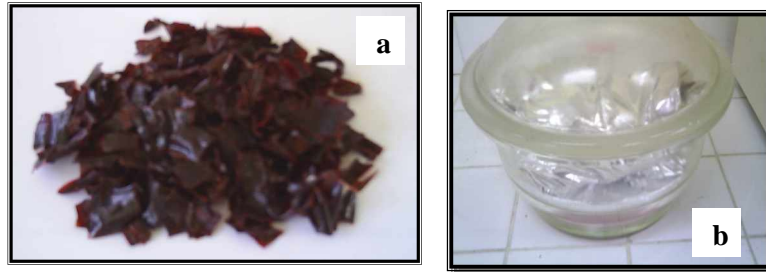


**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

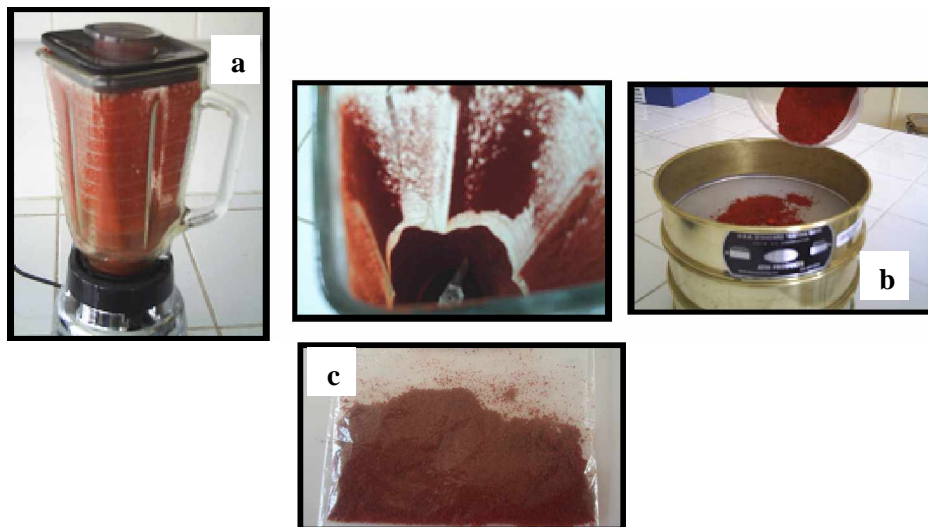
*Bach. Maharani Puccier Luna*

i) Enfriado: Las muestras secadas fueron colocadas en un desecador para poder mantener su humedad y darles un buen enfriamiento.



**Figura 37:** Fotografías del (a) Pprika troceado luego del secado  
(b) Enfriamiento del producto secado en el desecador

j) Molienda y tamizado: El páprika troceado seco, fue molido en una licuadora eléctrica al máximo velocidad por un tiempo de 2 a 3 minutos y luego tamizado hasta un tamaño partícula menor a 0.250 mm. Tamaño de partícula comercial para el colorante de páprika. Luego este polvo se almaceno en bolsas de polietileno transparente cubiertas por una segunda bolsa de color negro.



**Figura 38:** Fotografías del (a) Pprika molido, (b) páprika tamizado,  
(c) páprika en polvo obtenido enzimáticamente.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

3.4. Diseño Experimental:

Este estudio consistio en determinar la influencia de diferentes enzimas comerciales en la obtencion del colorante de Pprika, para ello se determino la enzima mas adecuada y los parametros adecuados de concentracion de enzima, dilucion y los parametros cineticos para el sustrato Pprika. En la figura 39. Se presenta un esquema del diseño experimental.

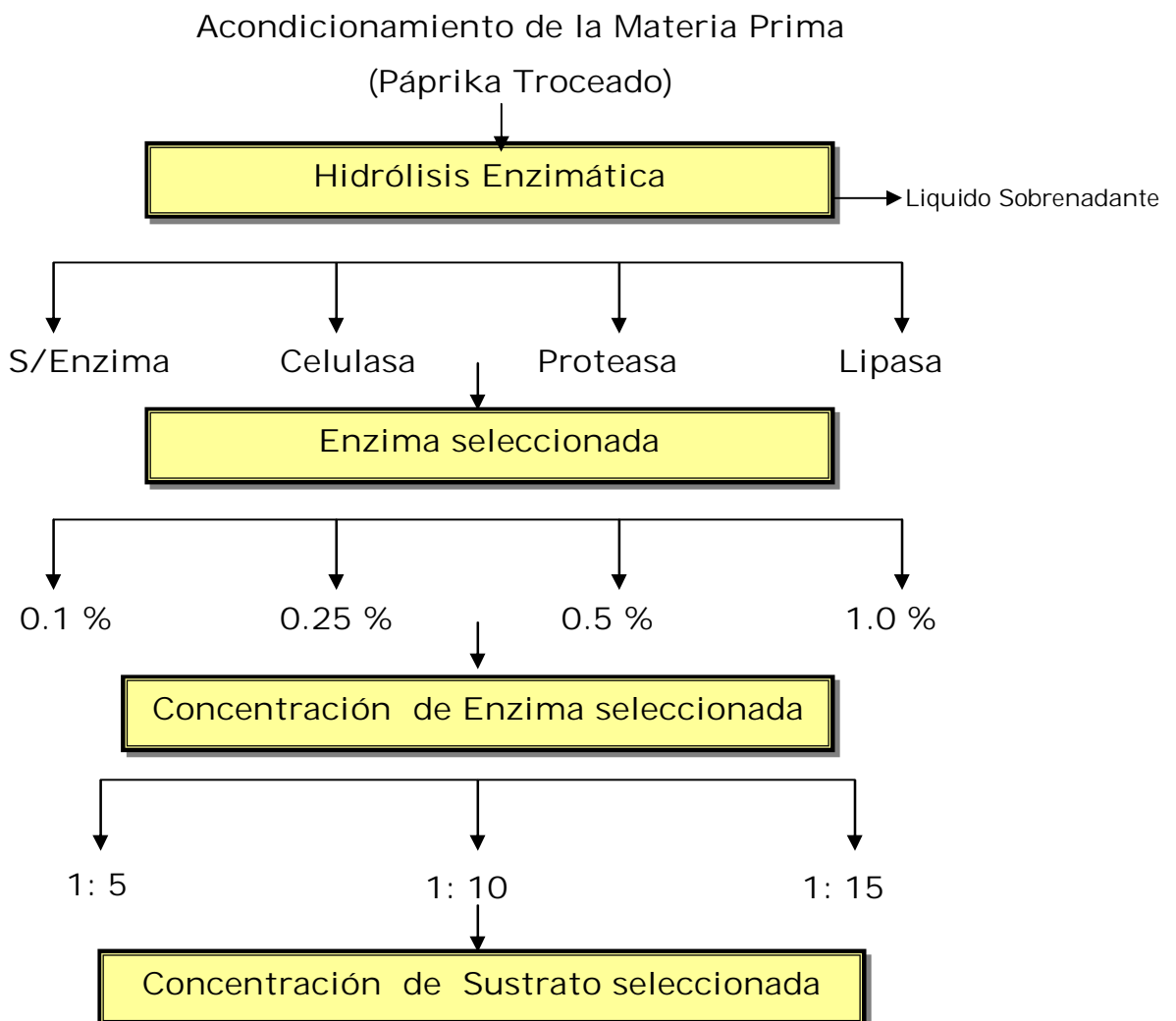


Figura 39: Esquema del diseño experimental para la obtencion del colorante de páprika

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

3.4.1. Influencia de las enzimas en la Obtención del Colorante de Pprika

El objetivo de esta prueba fue determinar la influencia de las Enzimas (Lipasa, Proteasa, Celulasa, s/enzima), que tuviera mayor efecto en la concentración de colorante de Pprika.

Se trabajo bajo las condiciones recomendada por el proveedor (Sigma, Bio-cat, Roche), para cada enzima., antes de agregar la enzima se acondicionó el Pprika con el Buffer a la temperatura adecuada de la reacción enzimática por 15 min., además se trabajo a una concentración de enzima constante 0.25 %, para cada enzima, referida al peso del páprika en base seca. Los otros parámetros que se mantuvieron constantes fueron:

- Ø Dilución: Proporción Pprika: Buffer: 1:10
- Ø Agitación: constante (120 rpm).
- Ø Variable: Lipasa, Proteasa, Celulasa, s/enzima (como patrón de referencia)
- Ø Temperatura: optima recomendada por el proveedor (Sigma, Bio-cat, Roche), para cada enzima.
- Ø pH: ptima recomendada por el proveedor (Sigma, Bio-cat, Roche), para cada enzima.
- Ø Tiempo: 2 horas



**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

Al final se seleccionó la enzima con cuya acción, se obtuvo una mayor concentración de colorante, bajo los resultados medidos en grados ASTA.

### 3.4.2. Influencia de la Concentración de Enzimas en la Obtención del Colorante de Pprika

En función de los resultados del estudio precedente (3.4.1).y como el objetivo de esta investigación es obtener enzimaticamente un colorante, se trabajo con la enzima que nos dio la mayor concentración de colorante de Pprika. Para ello se evaluó la influencia de la concentración de enzima en la obtención del colorante. Las concentraciones a evaluarse de enzima fueron de 0.1 %, 0.25 %, 0.5 %, 1.0 %, con respecto al peso del páprika en base seca, se evaluaron estas concentraciones tomando como base otras investigaciones con enzimas (Delgado, 2002; Salva, 1996), Los otros parámetros que se mantuvieron constantes fueron:

∅ Enzima: Seleccionada en el estudio precedente (3.4.1)

∅ Dilución: Proporción Pprika: Buffer: 1:10

Volumen de trabajo 1/10: (6 gr. de páprika y 54 ml. de buffer.)

∅ Agitación: constante (120 rpm).

∅ Variable: 0.1 %, 0.25 %, 0.5 %, 1.0 % (concentración de E/S).

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

Concentraci3n: 0.1 %(E/S) = (6gr. páprika y 0.003 gr. de enzima)

Concentraci3n: 0.25%(E/S)= (6gr. páprika y 0.015 gr. de enzima)

Concentraci3n: 0.5%(E/S)= (6gr. páprika y 0.03 gr. de enzima)

Concentraci3n: 1.0%(E/S)= (6gr. páprika y 0.06 gr. de enzima)

∅ Temperatura: 3ptima recomendada por el proveedor (Sigma, Bio-cat, Roche), para cada enzima.

∅ pH: 3ptima recomendada por el proveedor (Sigma, Bio-cat, Roche), para cada enzima.

∅ Tiempo: 2 horas.

Al final se seleccion3 el valor de Concentraci3n de Enzima con la que se obtuvo una mayor concentraci3n de colorante, bajo los resultados medidos en grados ASTA.

### 3.4.3. Influencia del Grado de Diluci3n del páprika en la obtenci3n del Colorante de Pprika.

Una vez seleccionada la enzima y la concentraci3n adecuada de enzima (3.4.1 y 3.4.2); se determin3 la influencia del grado de diluci3n en la obtenci3n del colorante de páprika. Se trabajo con las siguientes proporciones sustrato/buffer: 1/5, 1/10, 1/15. Los otros parámetros que se mantuvieron constantes fueron:

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

- ∅ Enzima: Seleccionada en el estudio (3.4.1)
- ∅ Concentraci3n de enzima: Seleccionada en el estudio (3.4.2).
- ∅ Sustrato: páprika 6 gr. Para todas las proporciones.
- ∅ Variable Diluci3n: Proporci3n Pprika/ Buffer: 1/5, 1/10, 1/15  
(S/diluci3n).  
Volumen de trabajo 1/5: (6 gr. de páprika y 24 ml. de buffer.)  
Volumen de trabajo 1/10: (6 gr. de páprika y 54 ml. de buffer.)  
Volumen de trabajo 1/15: (6 gr. de páprika y 84 ml. de buffer.)
- ∅ Agitaci3n: constante (120 rpm).
- ∅ Temperatura: 3ptima recomendada por el proveedor (Sigma, Bio-cat, Roche), para cada enzima.
- ∅ pH: 3ptima recomendada por el proveedor (Sigma, Bio-cat, Roche), para cada enzima.
- ∅ Tiempo: 2 horas.

Al final se seleccion3 el grado de diluci3n con el que se obtuvo una mayor concentraci3n de colorante, bajo los resultados medidos en grados ASTA.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

3.5. Analisis estadístico.

Para las pruebas de influencia de las enzimas y para realizar el estudio de la influencia que tienen los factores en diferentes niveles de: concentración de enzima y concentración de sustrato, en la obtención del colorante de Pprika, se realizo el Diseno Experimental Completo al Azar (D.C.A.).

Para concluir si existen diferencias significativas entre los niveles de los factores estudiados y determinar cual de estos niveles es el que brinda los mejores resultados se uso, la prueba de Duncan de Comparación de Promedios.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Elección de la Variedad de Pprika

Este análisis tuvo por objetivo seleccionar entre las variedades analizadas de Pprika (Queen, king, Sonora) la que tuviera mayor concentración de colorante.

Los resultados mediante el análisis de grados Asta, para las diferentes variedades, se muestran en el cuadro 8.

Cuadro 8: Valores de Grados Asta para las variedades de Pprika

Analizadas

Variedad	Grados Asta
Sonora	82.693
King	143.025
Queen	141.058

\*Promedio de 3 repeticiones

Con este análisis se demuestra que de las variedades estudiadas, la variedad King es la que tiene mayor cantidad de grados ASTA. Aunque en el análisis no se observo mayor diferencia significativa entre las variedades King de 143.025 y la variedad Queen de 141.058. Los valores obtenidos para todas las variedades

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

est n dentro de los reportados en la bibliografía. (Nicho, 2007). Se señala que la intensidad de color del P prika va desde 80 a 200 grados Asta. Además se realizo este análisis por la poca información bibliografica sobre una comparación de grados Asta, entre las variedades de P prika del Valle de Santa.

Es por ello que en base a este resultado, esta investigación se basa en la variedad king de 143.025 Grados Asta, porque tiene una mayor concentración de colorante medidos en Grados Asta, además de ser la más comercial de las variedades, dado que este valor coincide con el páprika que procesan y comercializan las empresas SaxPer  (Sociedad de Agricultores y Exportadores) y Miski de 140 Grados Asta.

Pero hay que aclarar que estos resultados pueden variar y que dependen de múltiples factores, como son, las condiciones climáticas, el grado de maduración de los frutos al recolectarse, el tipo de terreno de la cosecha, su preparación, el tipo de riego, la calidad de las semillas, etc. Esta aclaración es porque según ([Aguilar, 2006](#)); señala un valor de 120 grados Asta, para la variedad Queen, este valor es mucho menor a la de esta investigación que es de 141.058 Grados Asta, esto se pude deducir porque ellos utilizaron para su investigación variedades de P prika del Valle de Moquegua-Perú.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

**Variedad Sonora**



Longitud (cm.)	21.6
Diámetro (cm.)	4.08
Peso (gr.)	96.3



Muestra en polvo var. Sonora

**Variedad King**



Longitud (cm.)	16.5
Diámetro (cm.)	3.07
Peso (gr.)	22.84



Muestra en polvo var. king

**Variedad Queen**



Longitud (cm.)	15.38
Diámetro (cm.)	3.54
Peso (gr.)	33.46



Muestra en polvo var. Queen

Las variedades king y Queen tienen diferencias no significativas de su longitud esto crea una posible confusión al ser seleccionadas, para ello los resultados anteriores demuestran que la variedad Queen tiene los hombros mas anchos (3.54 cm.), mientras que la variedad King (3.07 cm.), la variedad Sonora es la que tiene mayor longitud de (21.6cm.) entre estas variedades.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

#### 4.2. Descripción de la Materia Prima

El páprika de la variedad king proveniente del Fundo San Antonio perteneciente a la corporación Social Agroindustrial Chinecas S. A.; es de forma alargada, tiene un valor de 147.39 grados Asta, este valor es ligeramente mayor al resultado obtenido con el páprika del Valle de Vinzos analizado en las pruebas anteriores que fue de 143.025 grados ASTA.

A este páprika seleccionado se le determinó el índice de madurez, los resultados experimentales se presentan en el cuadro 9.

Cuadro 9: Resultados experimentales para el análisis de índice de madurez

Análisis	Valores
Grados Brix sin corregir	26
g ácido cítrico anhidro / 100 mL	1.1102
�ndice de madurez	23.419



**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

4.2.1. Características físicas y Componentes estructurales del páprika variedad King

Para determinar las características físicas se tomó una muestra representativa páprika variedad king, en donde se obtuvo un peso promedio de 22.4 g. a su vez una longitud de 16.5 cm.; resultados que se encuentra, dentro de valores medios característicos de esta variedad y de un diámetro de 3.07 cm. Los componentes estructurales de esta variedad se muestran en el cuadro 10.

Cuadro 10: Componentes estructurales del páprika variedad king.

Componentes estructurales	Porcentajes
Pulpa	70.53 %
Semillas	12.359 %
Pedúnculo	10.764 %
Placenta	6.426 %

En el cuadro 10, se muestran los valores de la composición estructural del páprika fresco, del cual el 70.53 %, está formado por la pulpa este valor es importante porque incluye al endocarpio, mesocarpio y el exocarpio (cáscara), que es donde se encuentra el colorante del páprika. Otros componentes lo constituyen las semillas con un 12.359 %, pedúnculos 10.764 %, y placenta 6.426 %. Para

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

una mayor referencia se muestran en la figura 40 fotografías de estos componentes estructurales.



Figura 40: Fotografías de los componentes estructurales del páprika variedad king.

Estos valores son muy cercanos a los reportados por (Nuez et al, 1996) quienes señalan una composicion de 71.3 %, 20.5 %, y 8.2 % de pericarpio, pepas y peduculos respectivamente, pero este autor incluye en el termino pepas a las semillas y la placenta.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

#### 4.2.2. Características químicas

La determinación de la composición química porcentual del páprika en polvo y páprika en fresco, se muestran en el cuadro 11.

Cuadro 11. Composición química porcentual del páprika variedad King

Componentes	Pprika En polvo	Pprika En fresco
Humedad	10.513	73.138
Grasa	5.57	3.46
Fibra	31.11	14.34
Proteínas	15.75	4.82
Carbohidratos	30.603	14.01
Ceniza	6.454	1.72

Al comparar los resultados de la composición química porcentual obtenida tanto para el páprika en polvo, como para el páprika en fresco cuadro 11, con la composición química de la bibliografía, Cuadro 1. Se observa que el contenido de humedad de esta variedad de páprika en fresco es de 73.138 %, este valor est dentro rango reportado por ([Zapata et al, 1992 citado por Alcarza, 2003](#)) de 70 a 82 %, dependiendo del uso que se le va a dar y el tipo

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

de procesamiento. Además (Alcarza, 2003) trabajando con la variedad King reporta una humedad de 71.4 %.

(Santamaría et al, 2000) reportan diversos rangos para el páprika en polvo, humedad entre 6.0-14.5 %, grasa entre 6.2-15.3 %, fibra entre 17.0-25.0 %, proteínas entre 12.0-15.0 %, carbohidratos entre 30-35 %, cenizas entre 5.0-7.0 %; de estos valores la cantidad de grasa y fibra encontrados en este estudio no coinciden dentro de estos rangos, estas variaciones es posible que se deban a los efectos climatológicos y estacionales, tipo de suelo, etc. que influyen en la composición fisicoquímica de los productos agrícolas.

Es importante el valor de cada uno de estos componentes, porque las enzimas van a tener como sustratos a estos, como por ejemplo el valor de proteínas para la acción de las proteasas, y de la composición de estos depende el tipo de enzima a utilizar, porque las enzimas son específicas para cada sustrato.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

4.3. Influencia de la Forma a utilizar del páprika en la hidrólisis Enzimática (páprika troceado o en polvo).

Esta experiencia tuvo por objetivo seleccionar la forma a utilizar del páprika que tuviera mayor efecto en la concentración del colorante; sea troceado o en polvo. La comparación de resultados medidos en grados Asta, para el efecto individual del páprika troceado y páprika en polvo, se muestran en el cuadro 12.

Cuadro 12: Resultados para el efecto individual del páprika troceado y páprika en polvo

Tratamientos	Grados Asta Pprika Troceado	Grados Asta Pprika en Polvo
Sin enzima (referencia)	183.120	152.82
Proteasa	202.30	158.32
Celulasa	176.56	146.8
Lipasa	226.36	165.4

Al inicio se proponía trabajar con el páprika en polvo, debido que al disminuir el tamaño de partícula se disminuye el contenido de humedad y por tanto ocurre una mayor transferencia de masa y una mayor difusión del sustrato hacia el sitio activo de la enzima. Pero el

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

someter el páprika en polvo a la hidrólisis enzimática y luego filtración, se percibió que el líquido filtrado tuvo una coloración roja intensa, lo que representa una perdida de color del producto seco. Esto se muestra en al figura 41.

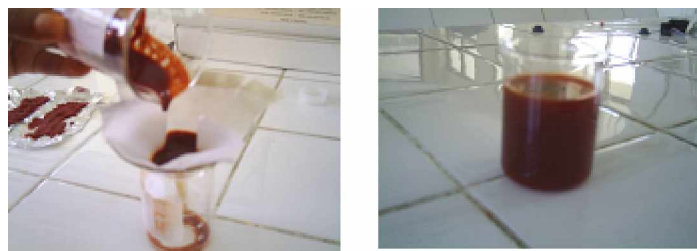


Figura 41: Fotografias del filtrado de páprika en polvo

La coloración del páprika es un privilegio casi exclusivo de los carotenoides pero hay también un poco de coloración soluble en agua, probablemente por los compuestos polifenólicos. ([Minguez-Mosquera, 1992](#)).

Se realizó una comparación entre el páprika troceado y el páprika en polvo, ambos bajo las mismas condiciones de hidrólisis, se obtuvieron resultados mayores con el páprika troceado que con el páprika en polvo, medidos en grados Asta. Como lo demuestran los valores de grados ASTA representados en la grafica 42.

## Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika (*Capsicum annuum*)

Bach. Sandro Bustamante Munives

Bach. Maharani Puccier Luna

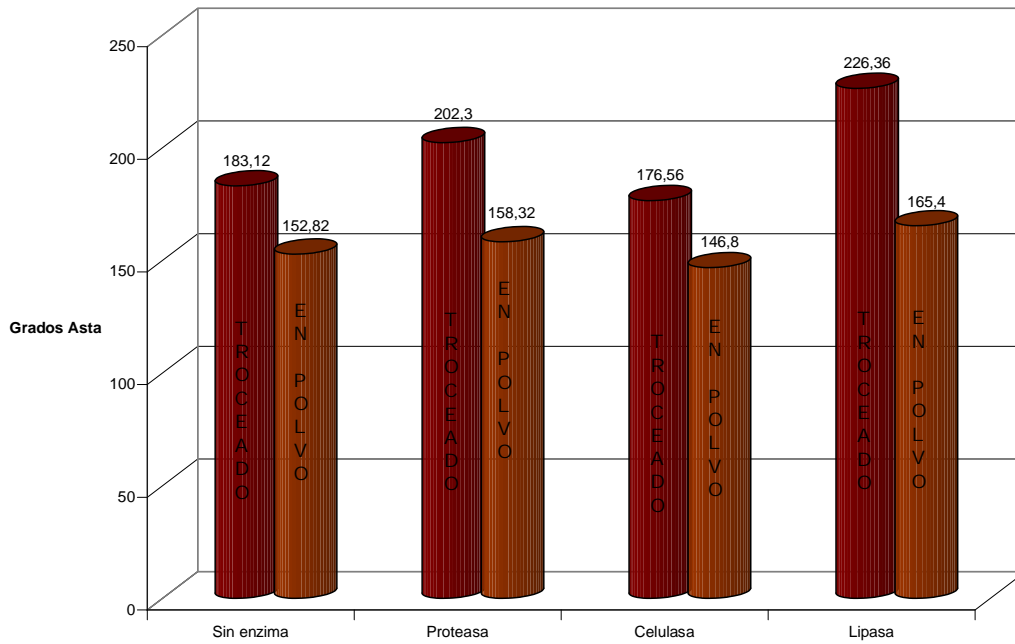


Figura 42: Representación grafica del efecto individual del páprika (troceado y en polvo).

Del grafico 42, usando la enzima lipasa, con el páprika troceado, se obtiene 226.36 ASTA y usando la misma enzima para el páprika en polvo, se obtiene 165.4 ASTA, lo que nos representa una perdida de color de 26.93 % medidos en  ASTA.

Estos resultados son debido a que luego de la hidrólisis con páprika troceado, el líquido sobrenadante, no representó mayor intensidad de color, por ende menor pérdida del mismo, debido a que los colorantes del páprika quedaron retenidos en el.

## **Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika (*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*



Figura 43: Fotografía del filtrado de páprika troceado

Por lo mencionado anteriormente, la forma del páprika a utilizar en la hidrólisis enzimática será el páprika troceado, puesto que nos representa una mayor concentración de colorante medidos en grados Asta y menos pérdida de color en el líquido filtrado.

### 4.4. Influencia de las enzimas en la Obtención del Colorante de Pprika

Este ensayo tuvo por objetivo determinar la influencia de las enzimas (lipasa, proteasa, celulasa) en la obtención del colorante de páprika. Los resultados de diferentes tratamientos enzimáticos, se muestran la figura 44.

Los resultados muestran que las preparaciones enzimáticas comerciales utilizadas (lipasa y proteasa) aumentan la concentración del colorante de páprika en un 20.715 % y 12.544 % respectivamente



## Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika (*Capsicum annuum*)

Bach. Sandro Bustamante Munives

Bach. Maharani Puccier Luna

pero este incremento es con respecto a la extracción sin enzima y solo en el caso de la enzima celulasa no se obtuvo mayor efecto. Pero para la comprobación de la actuación de la enzima celulasa se realizo el estudio de la cinética de hidrólisis enzimatica de la celulasa en el páprika (Anexo A1), midiéndose la generación de azúcares reductores en el liquido sobrenadante en el tiempo, encontrándose resultados positivos de cinética de hidrólisis, concluyéndose que a pesar del incremento en la formación de productos en el tiempo, los colorantes del páprika (carotenoides), no se encuentra unidos a sustancias celulolíticas (celulosa y hemicelulosa). Por lo que la influencia de esta enzima no representa una mayor significancia en la extracción de colorante medido en grados ASTA.

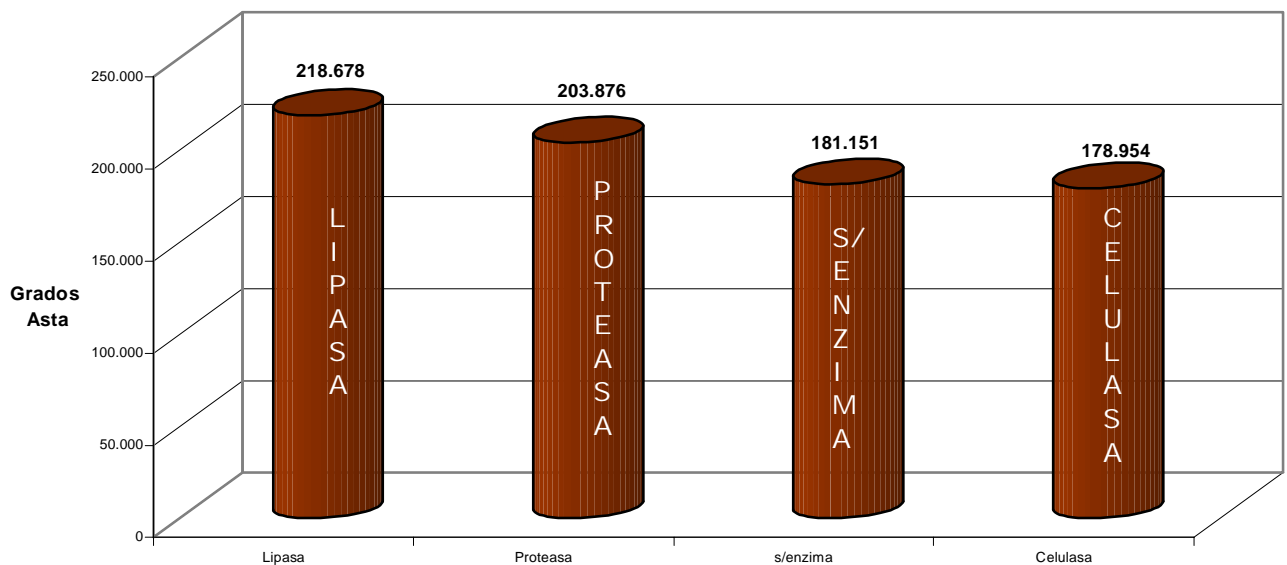


Figura 44: Efecto de las Enzimas en la Obtención del Colorante de Pprika

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

([Salva R, 1996](#)) en la extracci3n del colorante a partir de semillas de achiote, obtuvieron resultados favorables al incorporar un tratamiento enzimático en la extracci3n del colorante y señalan que debido a que en la capa externa donde se encuentra los pigmentos carotenoides de estas semillas contienen aproximadamente un 45 % de celulosa, cuya degradaci3n parcial, con enzimas celulolíticas, incrementan los rendimientos de extracci3n de bixina y norbixina en un 11.33 y 12.73 % respectivamente, pero este incremento es con respecto a la extracci3n acuosa.

([Paredes et al, 1997](#)) en la extracci3n del colorante de luteína a partir de caléndula, indican que el tratamiento enzimático es una alternativa viable para mejorar la producci3n de xant3filas extraídas de los pétalos de caléndula. El porcentaje obtenido de xant3filas represent3 un incremento del 53.9 %, superior con respecto a la cantidad obtenida con el proceso comercial.

([Delgado de la Borda, 2002](#)) en la concentraci3n enzimática del principio colorante de la cúrcuma en polvo, también obtuvieron efectos favorables al incorporar un tratamiento enzimático, incrementando en un 17.20 %, con la enzima amilasa con respecto al blanco (sin enzima), esto se debi3 a que la enzima amilasa degrada el almid3n, mayor componente encontrado en la cúrcuma. Además

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

señalan que la hidrólisis enzimática de la cúrcuma en polvo permitió concentrar los pigmentos en una 72 % con respecto a la cantidad obtenida con el proceso comercial.

Con respecto a la obtención enzimática de colorante a partir de páprika podemos señalar que el páprika debe su color a los pigmentos carotenoides que contiene, estos pigmentos en el páprika son del tipo liposolubles, termino que alude a los pigmentos que se encuentran asociados con sustancias grasas, motivo por el cual se obtuvieron mejores resultados con la enzima lipasa, teniendo como mecanismo de acción la hidrólisis de triglicéridos presentes en el páprika, permitiendo con esto concentrar en el páprika una mayor cantidad de colorante y eliminando en el liquido sobrenadante monoglicéridos resultantes de la hidrólisis.

Los resultados obtenidos demuestran que al aplicar un tratamiento enzimático, se obtiene una mayor concentración de colorantes (medidos en grados ASTA), con respecto al colorante obtenido comercialmente que es de 140 ASTA para la variedad King, esto se debió a que mediante la hidrólisis enzimática, se logro concentrar pigmentos en el páprika troceado a través de la eliminación de sólidos insolubles no coloreados en el liquido

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

sobrenadante, como es el caso de azucares, ácidos grasos, proteínas, etc. quedando los carotenoides (insolubles), retenidos en el páprika.

Las evidencias estadísticas (Anexo B1), indican con respecto a la influencia de las enzimas en la obtención del colorante de páprika, que entre la enzima celulasa y trabajar sin enzima no existe diferencias significativas, esto quiere decir que la enzima celulasa no tuvo mayor influencia en la obtención del colorante de páprika medido en grados ASTA. La prueba de comparación de Duncan indico que con la enzima lipasa se obtuvo 218.678 ASTA que representa la mayor concentración de colorante, seguido por la enzima proteasa de 203.876 ASTA.

Por lo mencionado anteriormente, la enzima más adecuada para la obtención enzimatica del colorante de páprika, es la enzima lipasa, puesto que permite concentrar la mayor cantidad de colorante en el producto obtenido medido en grados ASTA.

## Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika (*Capsicum annuum*)

Bach. Sandro Bustamante Munives

Bach. Maharani Puccier Luna

### 4.5. Influencia de la Concentraci3n de la Enzima Lipasa en la Obtenci3n del Colorante de Pprika

Luego de haber obtenido mejores resultados en la concentraci3n del colorante de páprika con la enzima Lipasa se procedi3 a determinar la menor concentraci3n de enzima que permita una mayor concentraci3n del colorante en el páprika. En la figura 45, se puede observar la influencia de la concentraci3n de Lipasa de *Candida rugosa*, en la obtenci3n del colorante de Pprika.

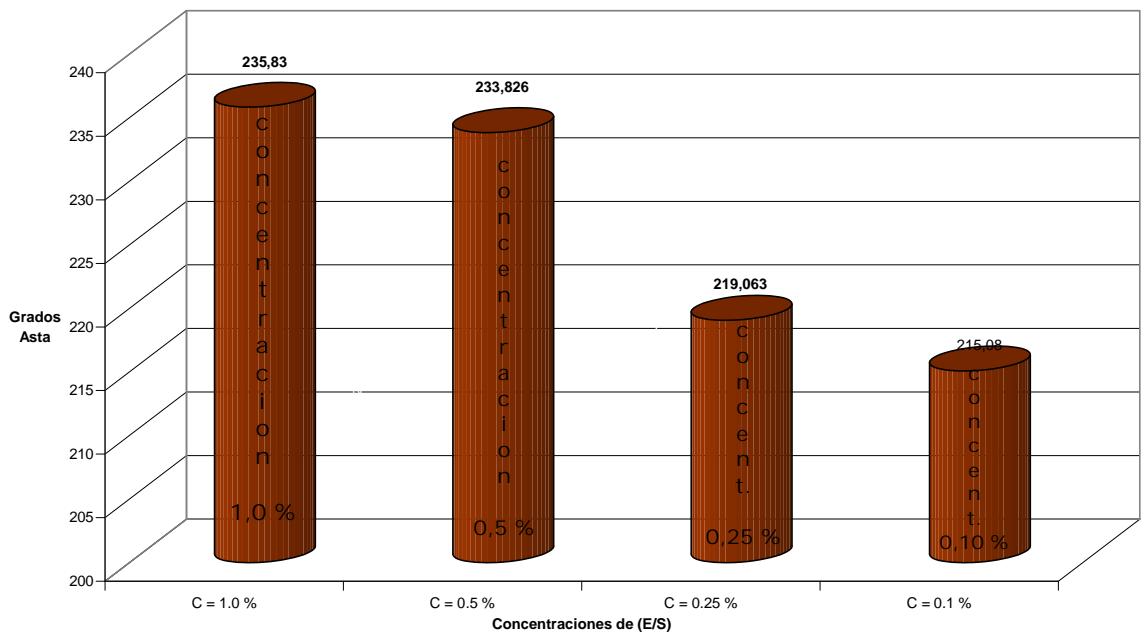


Figura 45. Representaci3n gráfica de concentraci3n de la enzima Lipasa en la obtenci3n del Colorante de Pprika

Los resultados muestran que al incrementar la concentraci3n de enzima se observa un incremento en la medida de grados Asta, del cuadro se tiene que, la concentraci3n del colorante de páprika

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

aumento en un 9.64 %, al subir la concentración de enzima 0.1 a 1.0 %. Pero sin embargo al incrementar la concentración de 0.5 % a 1.0% solo se tiene un rendimiento de 0.857 %; Esto es porque existe un límite en el cual para una cantidad de enzima existe una determinada cantidad de sustrato, una mayor concentración de enzima no con lleva a una mayor hidrólisis. Esto se debe a que las enzimas compiten entre si por el sustrato presente en el medio.

Las evidencias estadísticas (Anexo B2), indican con respecto al contenido de grados Asta que no existen diferencias significativas entre los tratamientos con concentraciones al 0.5 % y 1.0. Pero si hay diferencias significativas entre estos dos tratamientos y los tratamientos al 0.1 y 0.25 %.

Por lo mencionado anteriormente, la concentración más adecuada de lipasa para la obtención del colorante de páprika es de 0.5 % (E/S), puesto que a mayores concentraciones no permiten aumentar significativamente la concentración del colorante medido en grados Asta.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

4.6. Influencia del grado de diluci3n del páprika en la obtenci3n del colorante.

Luego de haber obtenido los mejores resultados en la concentraci3n del colorante de páprika con la enzima lipasa y una concentraci3n seleccionada de enzima del 0.5 % (E/S), se procedi3 a usar esta concentraci3n y a determinar la cantidad del medio (Buffer) que permiti3 obtener una mayor concentraci3n del colorante de páprika. Los resultados de la influencia del grado de diluci3n de la materia prima páprika, se encuentran en el cuadro 14.

Cuadro 14: Efecto del Grado de diluci3n en la Obtenci3n del  
Colorante de P prika

Grado de Diluci3n (substrato/Buffer)	Grados Asta
1: 15	237.633
1:10	234.64
1:5	225.77

Los resultados muestran que al incrementarse el medio de la reacci3n: proporci3n (substrato: buffer), se observa un incremento significativo en la medida de los grados Asta.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

A un grado de dilución (substrato: buffer) de 1:5 proporciona rendimientos significativamente menores debido a que la cantidad del medio utilizada era insuficiente para lograr una adecuada agitación del páprika troceado, debido a la mayor concentración del sustrato. (Domínguez et al, 1993 citado por Salva 1996) observó que en soluciones concentradas hay una menor eficiencia degradante de las enzimas, debido a la imposibilidad de repartirlas uniformemente o que se han saturado de producto las zonas donde se pueden llevar acabo la reacción. Esto explica el motivo por el cual el efecto enzimático en la concentración del colorante de páprika a una dilución de 1:5 fue el menor.

Al incrementarse el grado de dilución la viscosidad del medio disminuye, lo cual permitió una buena distribución de las enzima, del cuadro 14, se tiene que la concentración del colorante de páprika aumento en un 5.254 % al incrementar el grado de dilución (substrato: buffer) de 1:5 a 1:15. Sin embargo al incrementar el grado de dilución de 1:10 a 1:15 se tiene solo un rendimiento del 1.275 %; esto es debido a que la velocidad de las reacciones enzimáticas se hizo constante. Entonces no existe diferencias significativas entre las diluciones 1:10 y 1:15 ya que a mayores cantidades de solvente no se logra incrementar significativamente la concentración del colorante de páprika.



**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

Las evidencias significativas (Anexo B3) indican con respecto al contenido de grados Asta que no existen diferencias significativas entre los tratamientos con grado de diluci3n 1:10 y 1:15. Pero si hay diferencias significativas entre estos dos tratamientos y el tratamiento con grado de diluci3n 1:5.

Por lo mencionado anteriormente, el grado de diluci3n (substrato: buffer) más adecuado para la obtenci3n del colorante de páprika es 1:10, puesto que a mayores diluciones no permiten aumentar significativamente la concentraci3n del colorante de páprika, medido en grados Asta.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

4.7. Caracterización Colorimétrica. Coordenadas CIELab, del colorante de páprika y del colorante de páprika tratado enzimaticamente

El objetivo de esta prueba fue evaluar una comparación de color en (coordenadas CIELab), entre el páprika (materia prima) y el páprika tratado enzimaticamente en cada uno de los parámetros seleccionados y analizar las diferencias entre estos.

En la figura 46, se muestra las imágenes del colorante de páprika king y del colorante páprika tratado enzimaticamente.



Figura 46: Fotografías del colorante de páprika king y del colorante obtenido enzimaticamente en cada parámetro seleccionado.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

En el cuadro 15, se observan los valores  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  para cada parámetro seleccionado en el diseño experimental comparado con el páprika (usado como materia prima).

Cuadro 15. Parámetros CIELab del páprika y del páprika hidrolizado

Muestra	Coordenadas CIELab		
	$L^*$	$a^*$	$b^*$
Pprika ( <i>materia prima</i> )	30.18	39.28	36.95
Influencia de las enzimas ( <i>enzima seleccionada lipasa</i> )	27.07	36.33	29.57
Influencia de la concentración ( <i>Concentración seleccionada 0.5 %</i> )	32.33	39.21	31.07
Influencia de grado Dilución ( <i>Grado de Dilución seleccionada 1:10</i> )	37.10	42.88	42.78

Donde:  $L^*$  Luminosidad,  $a^*$  valores de rojo-verde,  $b^*$  valores de amarillo-azul

La luminosidad ( $L^*$ ), es una medida del grado de blancura en una escala de grises, A mayores valores de  $L^*$  más cercano es el color blanco. Del cuadro anterior se puede apreciar que el parámetro  $L^*$ , fue aumentando de acuerdo a cada prueba, iniciándose con una luminosidad de 30.18 para el páprika (materia prima), hasta llegar a un 37.10 para el páprika troceado con lipasa a una concentración

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

optima de 0.5 % y una dilución optima de 1:10. Esto nos indica que a medida que se iban encontrando los parámetros óptimos, el páprika hidrolizado era más luminoso que el páprika materia prima.

Valor ( $a^*$ ) rojo-verde, los valores  $a^*$  positivos indican el grado de color rojo y los valores negativos el grado de color verde. Del cuadro 14, se puede apreciar que el valor  $a^*$ , llega en la ultima prueba hasta un máximo de 42.88 e iniciándose con un valor  $a^*$  de 39.28 para el páprika usado como materia prima. Este valor es muy importante porque nos indica que existe una mayor coloración roja, y este valor nos podría representar una mayor concentración de colorante. Además este valor es complementado con las pruebas de la determinación de los parámetros de intensidad de color óptimos que también encuentran un incremento de color pero medido en grados Asta.

Valor ( $b^*$ ) amarillo-azul, los valores  $b^*$  positivos indican el grado de color amarillo y los valores negativos el grado de color azul. En todas las muestras el valor  $b^*$  es positivo y este valor acompañado el con el valor  $a^*$  representado en el diagrama cromático bidimensional nos representa una coloración anaranjada. Esto nos indica que el páprika no es solo un solo color, este es un color rojo-anaranjado.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

Por otro lado, los parámetros CIElab también pueden utilizarse para calcular la diferencia de color entre muestras ( $\Delta E$ ), Comparando el páprika hidrolizado con todos los parámetros óptimos y el páprika (materia prima), la diferencia de colores es de 9.73.

Los resultados de este método nos brindan la coloración exacta de la muestra como si fuera una carta de colores, mediante parámetros que permiten su especificación en un espacio tridimensional, Además de poder calcular las diferencias entre muestras, por más pequeñas que estas sean son registradas por el instrumento de alta resolución. Sin embargo se debe de aclarar que este método nos permite determinar cual de las muestras tiene mayor color y la evaluación de color es a un nivel superficial.

## Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika (*Capsicum annuum*)

Bach. Sandro Bustamante Munives

Bach. Maharani Puccier Luna

### 4.8. Analisis Enzimatico

Se realizo el estudio completo de la enzima Lipasa de *Candida rugosa*, porque esta permitio concentrar la mayor cantidad de colorante medidos en grados Asta en el Paprika.

#### 4.8.1. Determinacion de Proteinas

La cantidad de proteinas de la lipasa comercial en (mg/L), se determino por el metodo de Bradford. Esta determinacion nos permitio tener un criterio de pureza de la enzima comercial, puesto que cuanto mayor es el valor de proteinas, mayor ha sido la purificacion de esta preparacion comercial.

En el cuadro 16, muestran los valores de absorbancia obtenidos para la lipasa comercial de *Candida rugosa* (0.1 mg/L) en solucion de buffer fosfato 0.05 M, pH: 7.0.

Cuadro 16: Valores de absorbancia obtenidos para la; Determinacion de proteinas por el metodo Bradford.

Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio
0.102	0.106	0.106	0.104

A partir de la recta de calibrado, Anexo A3, se determino la cantidad de proteinas, expresandolo como proteina (mg/L).

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

Obteniéndose como resultados 12.426 % de proteínas de la lipasa comercial de *Candida rugosa*

(Weber, 1995 citado por De la Casa, 1999), reporta que la lipasa comercial de *Candida rugosa* contiene entre 2-11% (p/p) de proteína, el resto son azúcares y contaminantes.

(De la Casa, 1999), tuvo como resultado en su investigación un porcentaje de proteína para la Lipasa de *Candida rugosa* del 18 %

Entonces el porcentaje obtenido de 12.436 % esta dentro de los márgenes citados en la bibliografía, representndonos este valor el grado de pureza de la enzima.

#### 4.8.2. Determinación del Rango de Linealidad

Para esta prueba se utilizo la enzima lipasa de *Candida rugosa* por ser esta la de mayor efecto para la concentración del colorante de páprika, una dilución 1:10 (páprika: buffer) calculándose para esto un volumen total de 40 mL. A diferentes concentraciones de enzima. Se tomo muestras de 1 mL. cada 5 min. y se le determino el contenido de ácidos producido por titulación , para ello se le agrego una gota de fenoltaleina y luego se titulo con NaOH

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

(0.025 M) hasta el viraje rosado y se procedió a utilizar la siguiente formula .

$$\mu\text{mol ácidos producidos} = (\text{ml NaOH gastados})(0.025\mu\text{M})10^3$$

1 mL. de 0.025M de NaOH corresponde a una neutralización de 25  $\mu$ moles de ácidos producidos.

Cuadro 17: Valores de  $\mu$ mol ácidos producidos en el tiempo, para la enzima lipasa teniendo como substrato páprika

Tiempo(min.)	Concentración de Enzima			
	0,10%	0,25%	0,50%	1,00%
0	600	600	600	650
5	624	633,75	711,75	780
10	674,5	693,5	845,5	807,5
15	841,75	906,5	971,25	999
20	900	1062	1152	1188
25	1146,25	1242,5	1347,5	1356,25
30	1207	1275	1360	1326

Durante el proceso de hidrólisis enzimática pueden distinguirse dos fases. Hasta aproximadamente 25 min. Se produce una rápida difusión del substrato hacia la enzima, mientras que posteriormente el proceso corresponde a una ligera disminución de (25 a 30 min.), como consecuencia de que en el reactor se ha generado productos ácidos que tiene un efecto inhibitor sobre la actividad enzimática.



## Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika (*Capsicum annuum*)

Bach. Sandro Bustamante Munives

Bach. Maharani Puccier Luna

Disminuyendo así la velocidad de la reacción, esto se puede observar en la grafica 47. .

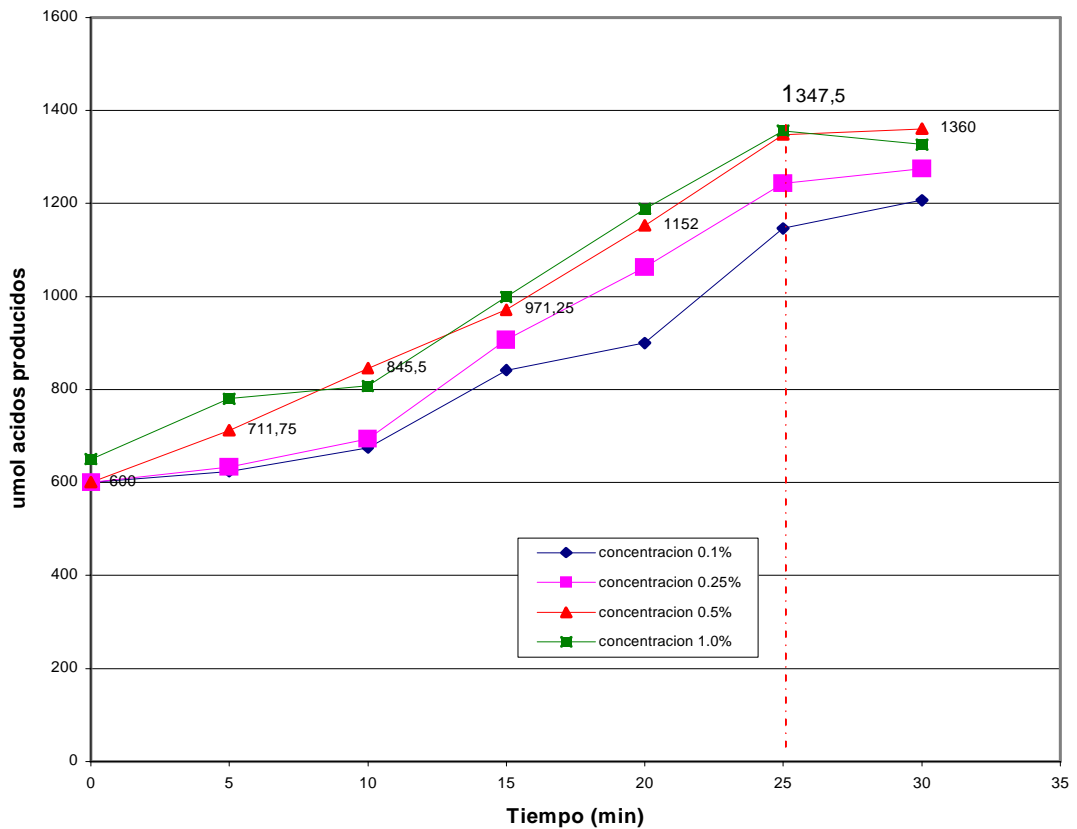


Figura 47: Representación grafica del Rango de linealidad de la Lipasa de *Candida rugosa* teniendo como substrato páprika

La mayor cantidad de  $\mu\text{mol}$  de ácidos producidos en un menor tiempo es para una concentración de enzima de 0.5% (enzima / substrato), el tiempo requerido de velocidad máxima es de 25 min.; y este valor es casi similar para todos los casos, por lo que el tiempo de hidrólisis para la lipasa de *Candida rugosa* teniendo como substrato páprika es de 25 min. Debido a que tiempos mayores no representan una mayor producción de  $\mu\text{mol}$  ácidos producidos.

## Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika (*Capsicum annuum*)

Bach. Sandro Bustamante Munives

Bach. Maharani Puccier Luna

### 4.8.3. Determinación de la Actividad Enzimática.

La actividad enzimática se determino con la concentración de enzima de 0.5 %; por ser esta la de mayor cantidad de  $\mu\text{mol}$  de ácidos producidos en un menor tiempo. La reacción es lineal hasta el periodo de 25 min. como se observa en la figura 48. en este periodo puede expresarse la actividad enzimática en función de la velocidad máxima, después de este periodo la grafica deja de ser lineal debido a que las reacciones generalmente reversibles y tienden al equilibrio. La velocidad de las reacciones puede disminuir por agotamiento del sustrato o por desnaturalización de la enzima.

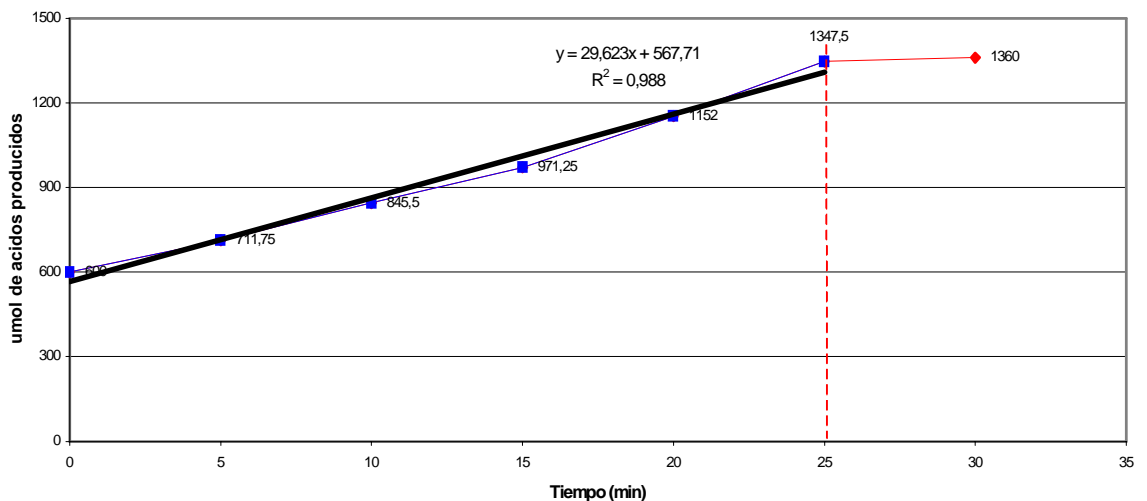


Figura 48: Representación grafica de la Actividad enzimática de la lipasa de Cándida rugosa teniendo como sustrato páprika

La actividad enzimática se calculo dividiendo la cantidad de  $\mu\text{mol}$  ácidos producidos entre el tiempo (min.) donde la curva deja de ser lineal, para una cantidad de enzima utilizada en (mg.).

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

$$\text{Unidad enzimática (U)} = \frac{1347 \text{ (}\mu\text{mol ácidos prod.)}}{25 \text{ (min.)}} = 53.9 \text{ U}$$

$$\text{Actividad enzimática (U/mg)} = \frac{53.9 \text{ (U)}}{0.03 \text{ gr.}} = 1.796 \text{ (U/mg)}$$

La enzima Lipasa de *Cándida rugosa* presento una actividad enzimática de 1.796(U/mg de proteína bruta), en un tiempo máximo de 25 min.

(Riveros, 1995), utilizo como materiales para su investigación la Lipasa de *Candida rugosa* con una actividad enzimática de 2.820 U/mg de proteína bruta.

Para comprobar este valor obtenido se realizo la experiencia de actividad en aceite de oliva (Anexo A2). Se obtuvo como actividad enzimática de la lipasa de *Candida rugosa* teniendo como substrato aceite de oliva 2.955 U/mg de proteína bruta.

De lo anterior se concluye que el valor obtenido de 1.796 (U/mg de proteína bruta) de actividad enzimática de la Lipasa de *Candida rugosa* teniendo como substrato páprika, es menor que el obtenido con aceite de oliva esto es debido a la composición de ácidos grasos del substrato.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

4.9. Determinación de los Parámetros Cinéticos.

Para esta prueba se utilizo lipasa de *Candida rugosa* y los parámetros seleccionados para la obtención del colorante de páprika, concentración de enzima 0.5 % (enzima / sustrato), y una concentración de sustrato de 1/10, por un tiempo máximo de hidrólisis de 25 min., para un volumen total de 40 ml. Se tomo muestras de 1 ml. cada 5 min. y se le determino el contenido de ácidos producido. En el cuadro 18, se muestra los valores de  $\mu\text{mol}$  de ácidos producidos en el tiempo.

Cuadro 18: concentraciones de producto formado, en  $\mu\text{mol}$  de ácidos producidos, para determinar los parámetros cinéticos, para la enzima lipasa teniendo como sustrato páprika troceado.

Tiempo (min.)	$\mu\text{mol}$ de ácidos producidos
0	131.25
5	255
10	500
15	615
20	756.25
25	805

En el cuadro 19, se presentan los valores de los interceptos para diferentes concentraciones de producto formado en el tiempo, usando el método de linealización Integrado.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

Cuadro 19: Valores para determinación  $V_{ap}$  y  $K_{ap}$  para diferentes concentraciones.

Tiempo (min.)	$y = (1/t) \ln(P/P_0)$	$x = ((P - P_0)/t)$
5	0.1328	16.75
10	0.2675	73.75
15	0.3089	96.75
20	0.3502	125
25	0.3627	134.75

Donde:  $t$  = tiempo = tiempo de hidrólisis donde la enzima lipasa alcanza su máxima velocidad = 25 min.

$P$  = concentración máxima de producto formado.

$P_0$  = concentración inicial de producto formado.

En el grafico 49, se presenta la curva hallada por el método de linealización Integrado, para la determinación de velocidad máxima de reacción aparente ( $V_{ap}$ ) y constante de Michaelis de sustrato aparente ( $K_{ap}$ ). Obteniéndose un coeficiente de correlación de datos de 0.9853 para un línea de regresión del tipo lineal.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de pprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

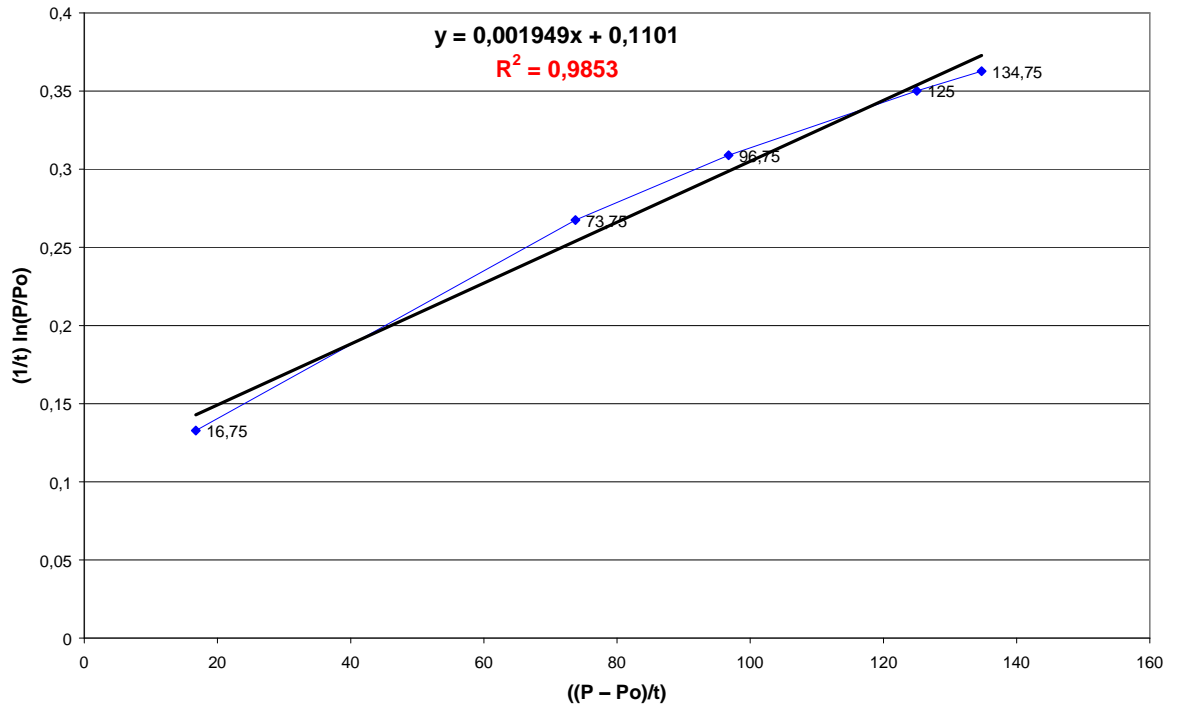


Figura 49: Determinación de los parámetros  $V_{ap}$  y  $K_{ap}$  a diferentes concentraciones de sustrato.

$$\frac{1}{t} \ln \frac{S}{S_0} = \frac{S - S_0}{t} \frac{1}{K_{ap}} + \frac{V_{ap}}{K_{ap}}$$

$a = 1/K_{ap} = 0.001949$   $\longrightarrow$   $K_{ap} = 513.083 \text{ (umoles)}$

$b = V_{ap}/K_{ap} = 0.1101$   $\longrightarrow$   $V_{ap} = 56.490 \text{ (umoles /min.)}$

$v = \frac{V_{ap} \cdot [S]}{k_{ap} + [S]}$   $\longrightarrow$   $v = \frac{56.490 [S]}{513.083 + [S]}$

En el cuadro 20, se presentan los valores de velocidad de reacción y su inversa; concentración de producto formado y su inversa, para la determinación de los parámetros cinéticos.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

Cuadro 20: Calculo de las inversas de  $v$  y  $[S]$  de los parámetros cinéticos

Tiempo	$v$	$1/v$	$[S]$	$1/[S]$
5	18.754	0.0533	255	$3.921 \cdot 10^{-3}$
10	27.880	0.0358	500	$2 \cdot 10^{-3}$
15	30.796	0.0324	615	$1.626 \cdot 10^{-3}$
20	33.655	0.0297	756.25	$1.322 \cdot 10^{-3}$
25	34.500	0.0289	805	$1.242 \cdot 10^{-3}$

Donde:

$v$  = velocidad de reacción ( $\mu\text{moles /min.}$ )

$[S]$  = concentración de producto formado en ( $\mu\text{moles}$ ) de ácidos producidos.

En el grafico 50, se presenta los interceptos de las inversas de velocidad de reacción y concentración de producto formado hallada por el método de linealización de inversos de Lineaweaver-burke, para la obtención de los parámetros cinéticos de constante de Michaelis de sustrato y Velocidad máxima de reacción. Obteniéndose un coeficiente de correlación de datos de 0.999 para un línea de regresión del tipo lineal.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

Bach. Sandro Bustamante Munives

Bach. Maharani Puccier Luna

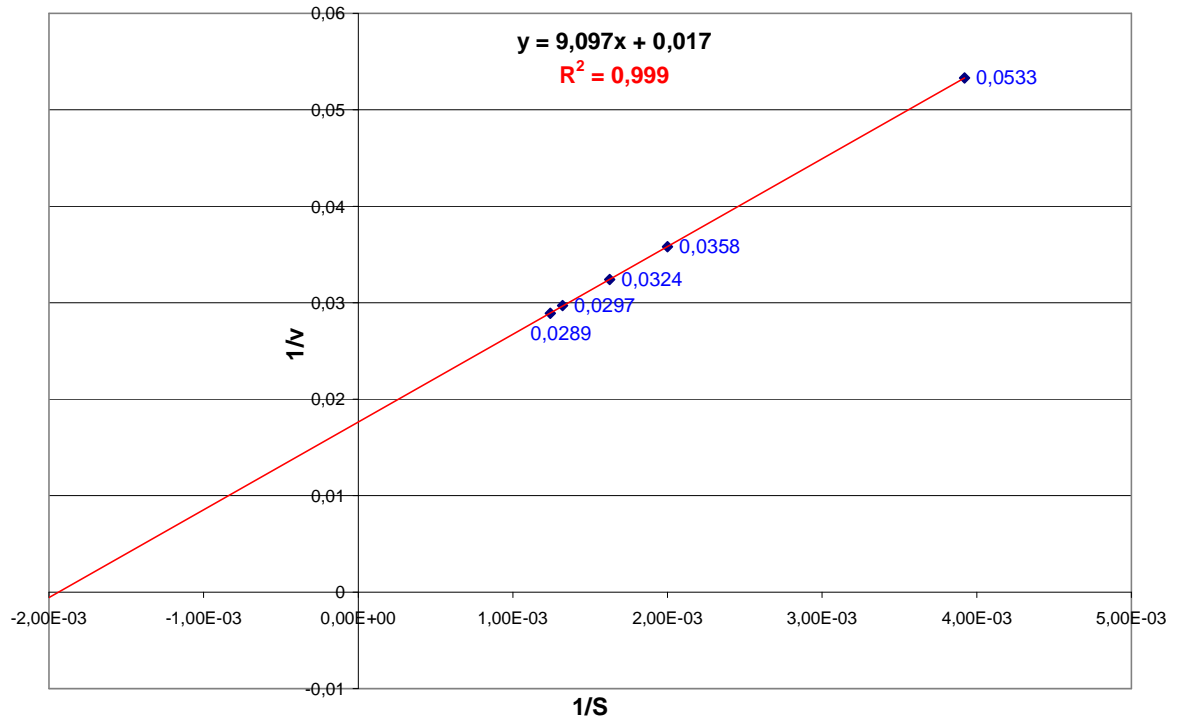


Figura 50: Determinación de los Parámetros Cinéticos  $V_{máx}$  y  $K_m$ , para la enzima lipasa teniendo como sustrato páprika.

$$\begin{aligned} x = 0 & \quad y = 1/V_{máx} = 0.017 \\ y = 0 & \quad x = b / a = 1/K_m = - (0.017 / 9.097) = - 0.001868 = -1.868 \times 10^{-3} \end{aligned}$$

$$K_m = 535.117 \text{ (umoles)}$$

$$V_{máx} = 58.823 \text{ (umoles /min.)}$$

Los parámetros cinéticos hallados de  $K_m$  y  $V_{máx}$ , obtenidos con los parámetros seleccionados de concentración de enzima, concentración de sustrato, tiempo de hidrólisis, usando la enzima lipasa de *Candida rugosa*, en la obtención enzimatica de colorante a partir de páprika, pueden ser usados como parámetros de operación en el diseño de reactores enzimáticos.



**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

## V. CONCLUSIONES

- Ø Las enzimas comerciales utilizadas: celulasa de *Aspergillus niger*, proteasa de *Bacillus subtilis* y lipasa de *Candida rugosa*, aumentan la concentración del colorante (medido en grados Asta), con respecto al páprika obtenido en un proceso comercial.
- Ø Los parámetros más adecuados para la hidrólisis Enzimática del páprika troceado, y que permitieron obtener la mayor concentración del colorante de páprika (medido en grados Asta), fueron los siguientes: Enzima lipasa de *Candida rugosa*, a pH = 7.0 y T = 37° C, concentración de enzima del 0.5 % (enzima /substrato), grado de hidrólisis 1:10 (substrato / buffer) y tiempo de hidrólisis de 25 minutos.
- Ø La hidrólisis del páprika troceado con la enzima lipasa de *Candida rugosa* aumento la concentración del colorante de páprika (medido en grados Asta) en un 20.2 % con respecto al blanco (sin enzima).

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

- Ø Trabajando con todos los valores de parámetros seleccionados para la hidrólisis enzimática, se obtuvo un rendimiento en la concentración del colorante (medido en grados Asta), del 67.6 %, con respecto a la cantidad obtenida con el proceso comercial.
  
- Ø El producto obtenido con todos los valores de parámetros seleccionados de la hidrólisis Enzimática permitió obtener un producto de mayor luminosidad, mayor coloración roja-amarilla, con respecto al color del páprika usado como materia prima, medido mediante el análisis colorimetrico, además de tener una diferencia de color entre estas de 9.73.
  
- Ø La enzima lipasa de *Candida rugosa* contiene un 12.426 % de proteína, un rango de linealidad, un mayor rango de linealidad para una concentración de 0.5% de (enzima / sustrato), actividad enzimática teniendo como sustrato páprika de 1.796 (U/mg. de proteína bruta), los parámetros cinéticos para el sustrato páprika son  $K_m$  de 535.117 ( $\mu\text{moles}$ ) y  $V_{máx}$  de 58.823 ( $\mu\text{moles}/\text{min.}$ ).

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

## VI. RECOMENDACIONES

- ∅ Realizar una caracterización fisicoquímica del producto.
  
- ∅ Realizar un estudio de estabilidad del colorante obtenido enzimaticamente en el tiempo.
  
- ∅ Realizar una hidrólisis secuencial de enzimas para la obtención del colorante de páprika.
  
- ∅ Realizar un estudio sensorial, evaluando el efecto de color, sabor y aroma, al utilizar el colorante obtenido enzimaticamente como aditivo coloreado en la industria alimentaria.
  
- ∅ Evaluar el método de extracción a nivel planta piloto, para la obtención del colorante de páprika, mediante hidrólisis Enzimática, analizando su rentabilidad y el producto obtenido.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Adney, B; Baker, J. (1996). *Laboratory Analytical Procedure*, extraído de la página; (<http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/4689.pdf>), 13-05-07.
2. Aguilar, M. (2006). *Determinación de la Calidad de Exportación en seis variedades de páprika en el Valle de Moquegua-Perú*. Trabajo Experimental. Universidad Nacional Agraria La Molina. (Lima-Perú).
3. Arjona, M; Iriarte, A; García, V; Amaya, S. (2003). *Contenido total de carotenoides en pimentón y oleorresina de la variedad Capsicum annuum I. Trompa de elefante*, extraído de la página; (<http://www.editorial.unca.edu.ar/Contenido%20total%20de%20carotenoides%20en%20pimentn.pdf>), 13-05-07
4. Arroyo, S. (1995). Síntesis de ácidos 2-aril propiónicos homoquirales mediante esterificación enantioselectiva catalizada por lipasas inmovilizadas. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid. (Madrid-España). extraído de la página; (<http://www.ucm.es/BUCM/tesis/19911996/D/1/AD1019501.pdf>), 16-05-07.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

5. A. S. T. A. (2004). *American Spice Trade Association*; extraído de la página; ; extraído de la página; (<http://www.astaspice.org/i4a/pages/index.cfm?pageid=1>), 02-04-07
6. Ascarza, A. (2003). *Utilización de agentes Permeabilizantes para la Optimización del tiempo de Secado del Pprika (*Capsicum annuum*)* tesis para obtener el titulo de Ingeniero en Industrias Alimentarias. UNALM (lima- Perú).
7. Barba, P; Pacherre, C; Paredes, Q. (2002) *Proyecto de Instalación de una planta procesadora de Aj Pprika Deshidratado y Molido*. Informe para Obtener el Titulo de Ingeniero Agroindustrial por Curso de Titulación. UNS (Chimbote-Perú).
8. Basurto, M. (2001). *Todo sobre el Pprika*; extraído de la página; (<http://www.geocities.com/lebr7/paprikacastellano.htm>), 16-02-06.
9. Brezmes, LI. (2001). *Diseño de una nariz electrónica para monitorizar el grado de maduración de la fruta*, extraído de la página; ([http://www.tdx.cesca.es/TESIS\\_UPC/AVAILABLE/TDX-0121102-113518//CAPITOL2.pdf](http://www.tdx.cesca.es/TESIS_UPC/AVAILABLE/TDX-0121102-113518//CAPITOL2.pdf).) 13-06-07

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

10. Boscarol, (2007). *Colorimetría*, extraído de la página; (<http://www.gusgsm.com/colorimetria>), 02-11-07
11. Botanical, (2001). *Capsantina*, extraído de la página; (<http://www.botanical-online.com/medicinalescapsantina.htm>) 16-02-06.
12. Casas, A. (2002). *El cultivo de páprika en la costa peruana*, extraído de la página; (<http://www.sira-arequipa.org.pe/principal/inftecnica/manuales/paprika.doc.htm>), 13-06-07.
13. Calvo, J. (2004). *Enzimas*, extraído de la página; (<http://www.qb.fcen.uba.ar/quimicabiologica/Trabajo%20con%20enzimas.htm>), 15-05-07
14. Cepes. (2007). *Pprika*. extraído de la página; (<http://www.cepes.org.pe/revista/r-agra30/esta-01.htm>).13-06-07
15. Dávila, R. (2005). *Evaluación de la Pérdida de Color A.S.T.A y Evaluación Microbiológica en el Proceso de Molienda y Peletizado del Pimiento Pprika (*Capsicum annuum* L.)*. Tesis para Obtener el Título de Ingeniero en Industrias Alimentarias. UNALM (lima- Perú).

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

16. Delgado de la Borda, J. (2002). *Concentraci3n enzimática del principio colorante de la cúrcuma (*Cúrcuma longa* L.) en polvo*. Tesis para Obtener el Título de Ingeniero en Industrias Alimentarias. UNALM (lima- Perú).
17. Derinat, (2003). *Pprika*; extraído de la página; (<http://www.derinat.com/colorant.htm>), 03-06-07.
18. De la Casa, F. (1999). *Obtenci3n y Estabilizaci3n de Lipasa de "candida rugosa": Utilizaci3n en medios orgánicos con  $a_w$  controlada*. Tesis para Obtener el grado de Doctor en Farmacia, Universidad complutense de Madrid (Madrid-España).
19. Duarte. (2007). extraído de la página; (<http://www.monografias.com/trabajos35/exportacion-páprika/exportacion-páprika.Shtml>), 16-06-07.
20. Enzyme Development Corporation (2007). *Guía para la compra de enzimas*, extraído de la página; ([http://enzymedevelopment.com/es/pdf/nGuia\\_paraLaCompra\\_de\\_Enzimas.pdf](http://enzymedevelopment.com/es/pdf/nGuia_paraLaCompra_de_Enzimas.pdf)), 03-04-07.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

21. Enzyme Structures Database (2003). *Nomenclatura de Enzimas*, (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/enzymes/>), 02-05-07.
22. Fisher, C; Kocis, J. (1987). *Separation of Paprika Pigments by HPLC* . Journal of the Science of food and Agriculture N  35, pp. 55-57.
23. Gálvez, L. (2006). *Efecto de la aplicación de complejos enzimáticos sobre el tiempo de fermentación en la elaboración de salsa de soya tipo sillao*. Tesis para obtener el título de Ingeniero en Industrias Alimentarias. UNALM (Lima- Perú).
24. Guevara-González, A. (1996). *Evolution of Color during the Ripening of Selected Varieties of Paprika Pepper (*Capsicum annuum* L.)* J. Agric. Food Chem. N  44, 2049-2052.
25. Hernandez, J; Dorantes, L; Jaramillo, M; Ramiro, A. (2003). *Determinación de color de algunas variedades de Capsicum y su Relación con Carotenoides Totales*. extraído de la página; ([http://www.world-pepper.org/wpc2005/memorias2005/wpc2005\\_Inocuidad.pdf](http://www.world-pepper.org/wpc2005/memorias2005/wpc2005_Inocuidad.pdf)), 13-05-07.



**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

26. Illanes, A. (1994). *Bioteología de Enzimas - Cinética Enzimática*. Ediciones Universitarias de Valparaíso.
27. Instituto Peruano del Espárrago y Hortalizas "IPEH", (2004). *P prika*; extraído de la página; (<http://www.ipeh.gob.html>), 08-02-06.
28. JECFA *Paprika Oleoresin* (2002). Prepared at the 35th JECFA (1989), published in FNP 49 (1990) and in FNP 52 (1992). Metals and arsenic specifications revised at the 59<sup>th</sup> JECFA (2002).
29. King, J. (1968). *Enzimolog a Clínica Pr ctica* Editorial Acribia, (Zaragoza España).
30. Krajayklang, M; Klieber, A; Dry, R. (2000). *Colour at harvest and post-harvest behaviour influence paprika and chilli spice quality*. Postharvest Biology and Technology N  20, pp. 269-278, extraído de la página; (<http://www.fao.org/inpho/content/documents/vlibrary/ad419s/ad419s00.pdf>), 19-08-07

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

31. Lehninger. (1982). *Bioquímica*, Segunda Edición. Editorial Omega S. A (Barcelona-España).
32. Lock, S. (1997). *Colorantes Naturales*, Universidad Pontificia Católica U. P. C. (Lima-Perú). Cp. II.
33. Maynero, G. (1997). *Estado del Arte*. Colorimetría. pp. 15-42, extraído de la página; (<http://www.taz.uv.es/~esther/Estado.pdf>), 03-04-07.
34. Mínguez-Mosquera, M.; Jarn-Galn, M; Garrido-Fernández J. (1992). *Color Quality in Paprika*. Journal of the Science of food and Agriculture N 77, pp. 2384-2388, extraído de la página; ([http://www.pubs.acs.org/cgi-bin/abstract.cgi/jafcau/1992/40/i12/fdf/f\\_jf00024\\_a012.pdf](http://www.pubs.acs.org/cgi-bin/abstract.cgi/jafcau/1992/40/i12/fdf/f_jf00024_a012.pdf)), 03-04-07.
35. Navarro, F; Costa, J. (1993). *Evaluación del color de pimentón por colorimetría de triestímulos*. Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Vol. 33, N 4, pp. 427-434. España.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

36. Newsome, R. (1986). *Food Colour*. Revista Journal of Food Technology. Vol. 40. N 7, pp. 49-56. EEUU.
  
37. Nicho, S. (2003). *Cultivo de Aj Pprika*, extraído de la página; (<http://www.inia.gob.pe/SIT/consPR/adjuntos/1359.pdf>), 06-03-07.
  
38. Nolasco. (2005). *Digestibilidad in vitro de lípidos alimentarios para el camarn*, extraído de la página; (<http://www.3.dsi.uanl.mx/publicaciones/maricultura/viii/pdf/23Nolasco.pdf>), 06-05-07.
  
39. Norma Oficial Mexicana NOM-119-SSA1. (1994). *Bienes y Servicios Materias Primas para Alimentos, Productos de Perfumería y Belleza. Colorantes Orgánicos Naturales. Especificaciones Sanitarias*, extraído de la página; (<http://www.plazasol.uson.mx/hge/Informacion%20general/119ssa14.doc>), 17-05-07
  
40. Nuez, F; Gil, R; Costa, J. (1996). *El cultivo de Pimientos Chiles y Ajies*. Ediciones Mundi Prensa. (Madrid-Espana)

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

41. Purseglove, J; Bronw, R. (1981). *Species* Revista Vol. I,1ra Edición. Editorial Huntsmen FOCET Printing Pte Ltd. EEUU.
42. Protein Data Bank "PDB". (2006). *Enzyme structures database*, extraído de la página; (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum/GetPage.pl?pdbcode=1ks5>), 29-04-07
43. Riveros, D. (2005) *Estudio de la Hidrólisis del crudo de aceite de Palma africana empleando como catalizador la lipasa de C. rugosa*. Revista N  22 de Ingeniería, Universidad de los Andes.-Colombia, pp. 45-53.
44. Rigon, S. (2005) *Produ o de enzimas amilolíticas fúngicas  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase por fermenta o no estado sólido*. Disserta o aprovada como requisito parcial para obten o do grau de Mestre no Programa de Pós- Gradua o em Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.
45. Ryan, M. (2000). *Technical aspect of enzyme utilization: Dry vs liquid enzymes*, extraído de la página; (<http://ressources.ciheam.org/om/pdf/c26/97605982.pdf>), 29-04-07

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de p prika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

46. Salva, R. (1996). *Utilización de enzimas en la extracción de Bixina a partir de semillas de Achiote (Bixa orellana)*, Tesis para obtener el título de Ingeniero en Industrias Alimentarias. UNALM (Lima- Perú)
47. Santamaria R; Reyes-Duarte, M; B rzana, E; Fernando, F; Gama F; Mota, M; López-Munguia, A. (2000). *Selective Enzyme-Mediated Extraction of Capsaicinoids and Carotenoids from Chili Guajillo Puya (Capsicum annuum L.) Using Ethanol as Solvent*. Journal of the Science of food and Agriculture N  48, pp. 3063-3067, extraído de la página; (<http://www.geocities.com/NapaValley/3378/capsaicinarticle12.htm>), 17-05-07
48. Sinisterra, G. (2005). *Biotransformaciones catalizadas por microorganismos y su relación con la Agroindustria y la industria Farmacéutica*. Curso Internacional de Postgrado, 21-26 de noviembre, UNS-chimbote-Perú.
49. Soko. (2007). *Enzimas Catalizadores Biológicos*, extraído de la página; (<http://soko.com.ar/Biologia/Enzimas.htm>), 08-07-07
50. Villavicencio. (1995). *Bioquímica*, Tomo I. CONCYTEC

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

51. Yamamoto, P. (1995). *Obtención de Oleorresina de Pprika (Capsicum annuum) utilizando como solvente alcohol tílico y hexano.* tesis para obtener el título de Ingeniero en Industrias Alimentarias. UNALM (lima- Perú).

52. Zarc International. INC. (2001). *Productos of capstun p- páprika;* extraído de la página; ([http://www.capstun.com/english/capstun/tech\\_info/oc/index.html](http://www.capstun.com/english/capstun/tech_info/oc/index.html)), 12-08-07

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

# ANEXOS

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

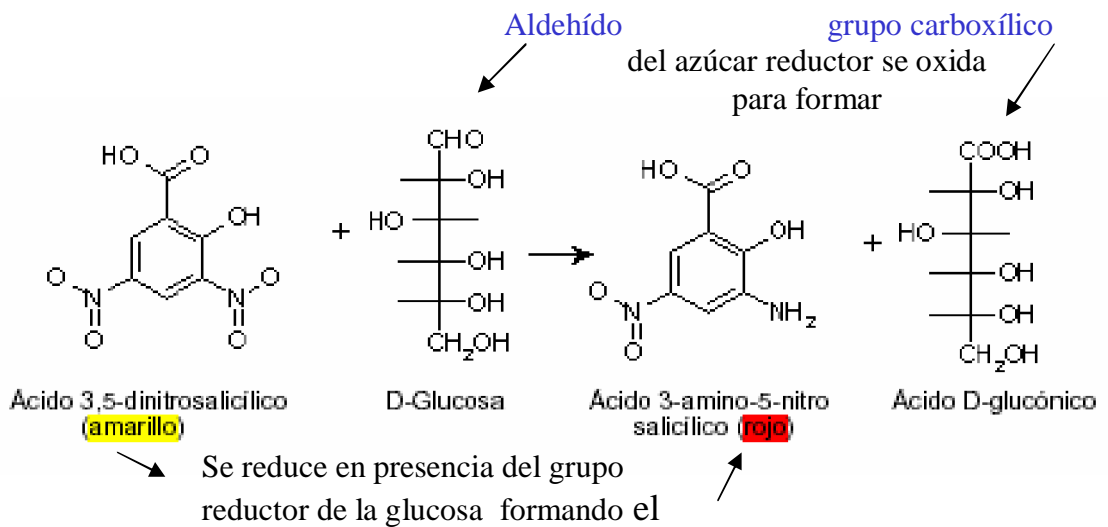
*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

**Anexo A1**

Cinética de Hidrólisis Enzimática de la Celulosa.

El seguimiento de la velocidad de hidrólisis enzimática para este ensayo con celulosa, se ha controlado por medio de la determinación del contenido de azúcares reductores solubles (gr/lit), producidos en el baño residual (buffer) a diferente tiempos. Para ello se ha utilizado ácido dinitrosalicílico (DNS), como reactivo sensible a los productos de la reacción, empleando glucosa como reactivo patrón para la obtención de la curva de calibrado.



**REACCION QUIMICA DE LA GLUCOSA CON EL DNS**



**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

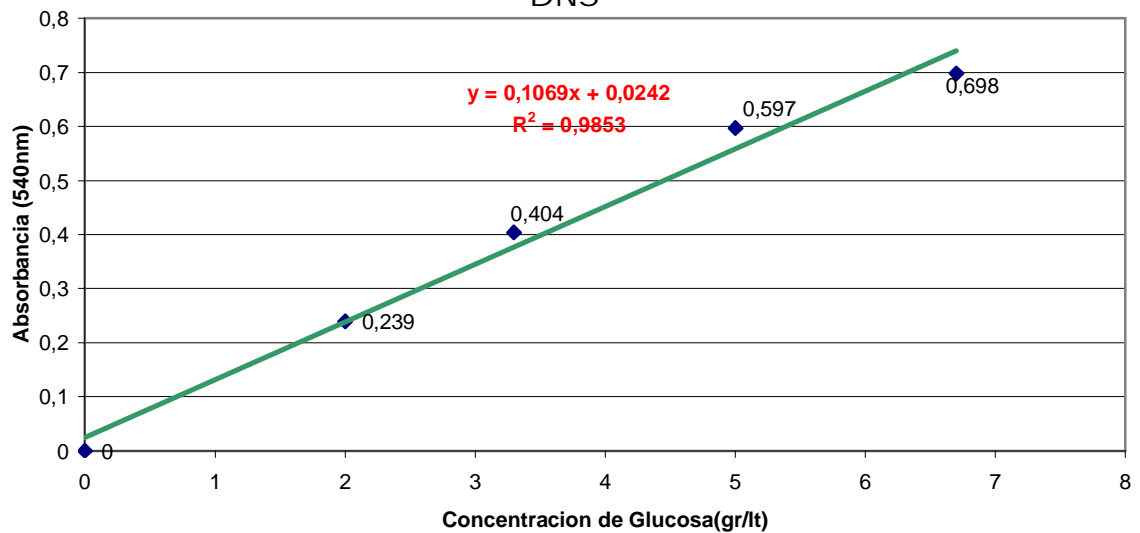
Preparación de la Curva de Calibrado:

La curva de calibrado se determino a partir de una solución estándar de glucosa de 10(gr/lt) = (1gr/100 ml.).

Tabla A1.1. Datos experimentales para obtener la curva de calibrado de glucosa

Concentración Glucosa g.L <sup>-1</sup>	Absorbancia 540 nm			
	Repeticiones			Promedio
2.0	0.237	0.246	0.236	0.239
3.3	0.412	0.385	0.415	0.404
5	0.586	0.629	0.576	0.597
6.7	0.713	0.693	0.690	0.698

Figura. A1.1. Curva de calibrado de Glucosa, utilizando el reactivo DNS



Donde:  $y = 0.1069x + 0.0242$   $R^2 = 0.9853$

y: Absorbancia 540 nm

x : Concentración de Glucosa g.L<sup>-1</sup>

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

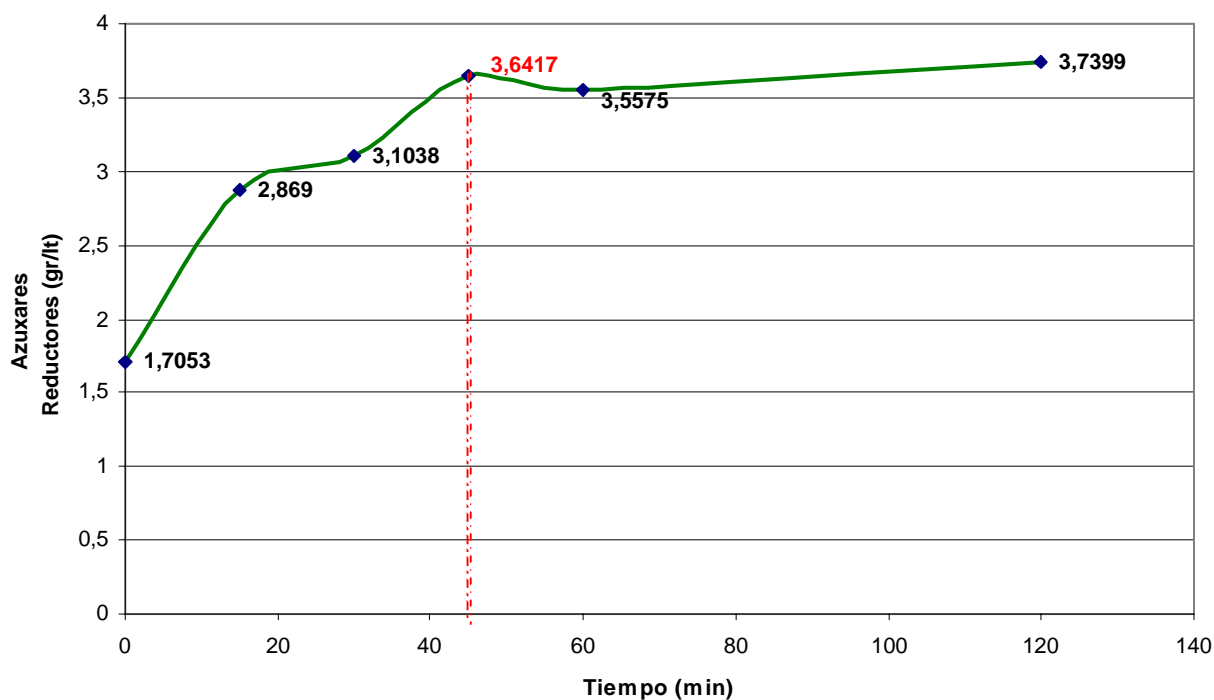
*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

Tabla A1.2. Resultados experimentales de la Cinética de Hidrólisis enzimática con celulasa teniendo como substrato páprika concentración de enzima (E/S = 0.5%), dilución (1:10).

Tiempo (min.)	Concentración Glucosa g.L <sup>-1</sup>	Absorbancia 540 nm			
		Repeticiones			Promedio
0	1.7053	0.204	0.208	0.206	0.206
15	2.869	0.331	0.332	0.331	0.331
30	3.103	0.387	0.361	0.322	0.356
45	3.641	0.394	0.418	0.427	0.413
60	3.557	0.411	0.396	0.405	0.404
120	3.739	0.424	0.431	0.419	0.424

Figura. A1.2. Representación grafica de la cinética se hidrólisis enzimática con celulasa teniendo como substrato páprika



**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

No se realizó un estudio más complejo sobre la cinética de esta enzima, porque con esta enzima no obtuvimos buenos resultados de concentración de colorantes mediante la determinación de grados Asta, pero con este ensayo se comprueba el incremento de azúcares reductores en relación directa con el tiempo, para un máximo de 45 min. Este incremento es debido a que la reacción enzimática conduce a la degradación de componentes de la pared celular (principalmente celulosa y hemicelulosa), lo que provoca un incremento en la permeabilidad de la célula que mejora la transferencia de los componentes hidrosolubles en los tejidos del páprika hacia la fase líquida.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

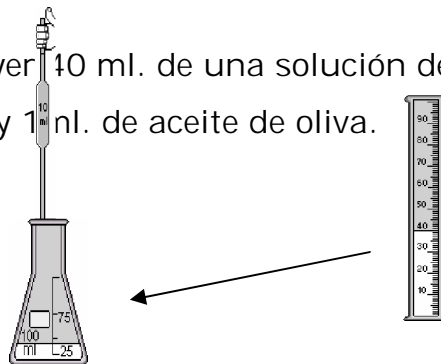
**Anexo A2**

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA LIPASA DE *Candida rugosa***

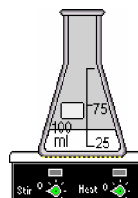
La actividad enzimática de la lipasa de *Cándida rugosa* se calcula en base a la cantidad de ácidos producidos en la hidrólisis de aceite de oliva, esto se realiza mediante la neutralización por adición de una base de los ácidos grasos liberados en la reacción hidrolítica, de forma que el pH del medio permanezca constante. Esta técnica es conocida como el método del pHstato es utilizada generalmente como ensayo de referencia. La actividad se determino en unidades enzimáticas (U), bajo las condiciones de ensayo. La actividad enzimática fue determinada por el método seguido por (Sinisterra, 2005).

Procedimientos:

1. Se toma en un erlenmeyer 40 ml. de una solución de Buffer fosfato pH =7.0, 0.05M y 1ml. de aceite de oliva.



2. Seguidamente se pone por 20 min. en el Shaker a 37 C y 150 rpm.

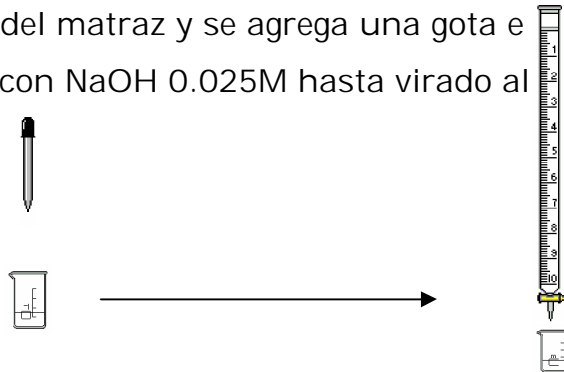


**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

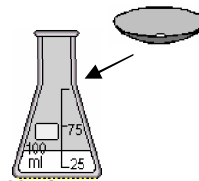
*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

3. Se toma un 1ml del matraz y se agrega una gota e  
y luego se titula con NaOH 0.025M hasta virado al  
se y se  
anota el gasto.



4. Se agrega 0.01 gr. de enzima al matraz y a partir de ese  
instante se toma como t = 0 min. llevando nuevamente al  
Shaker por 15 min. a T 37° C, a 300 rpm. Y luego se procede  
igual que el paso 3.



5. Luego se realiza lecturas cada 15 min.

$$\mu\text{mol ácidos producidos} = (\text{ml NaOH gastados}) \times 0.025 \mu\text{M} \times 10^3$$

1 ml. de 0.025M de NaOH corresponde a una neutralización de 25  
μmoles de ácidos producidos

Resultados:

Cuadro A2. Valores en μmol ácidos producidos obtenidos después de  
la acción enzimática de Lipasa de Cándida rugosa en aceite de oliva a  
diferentes tiempos.

Tiempo (min.)	Gasto(ml)	μmol ácidos producidos (en 1 ml)	μmol ácidos producidos (totales en el matraz ml)
0	0.3	$0.3 \times 0.025 \times 10^3 = 7.5$	$7.5 \times (41/1) = 307.5$
15	0.8	$0.8 \times 0.025 \times 10^3 = 20$	$20 \times (40/1) = 800$
30	1.1	$1.1 \times 0.025 \times 10^3 = 27.5$	$27.5 \times (39/1) = 1072.5$
45	1.4	$1.4 \times 0.025 \times 10^3 = 35$	$35 \times (38/1) = 1330$
60	1.5	$1.5 \times 0.025 \times 10^3 = 37.5$	$37.5 \times (37/1) = 1387.5$
75	1.6	$1.6 \times 0.025 \times 10^3 = 40$	$40 \times (36/1) = 1440$
105	1.6	$1.6 \times 0.025 \times 10^3 = 40$	$40 \times (35/1) = 1400$
345	1.6	$1.6 \times 0.025 \times 10^3 = 40$	$40 \times (34/1) = 1360$

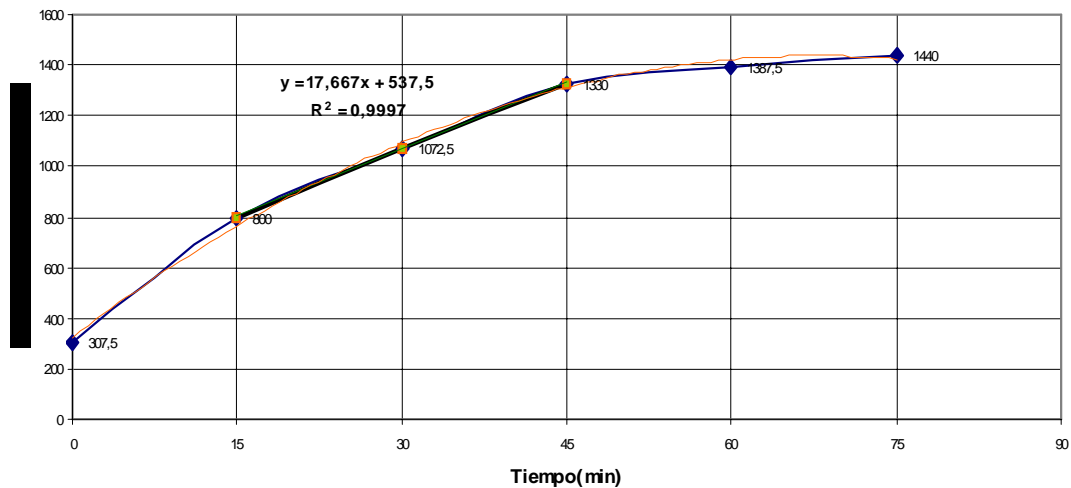
**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

La actividad enzimática se calculó considerando que la velocidad inicial de formación de producto tiene un comportamiento lineal. Para esto se trabajo con los puntos que siguieron dicho comportamiento lineal. Dicha tendencia es mostrada en el figura A2 como una línea. Al realizar la regresión lineal entre los valores de 15 a 45 min. Se obtiene una correlación de 0.9997.

Figura A2. Representación grafica de la curva de Actividad enzimática de Lipasa de Cándida rugosa en aceite de oliva.



La actividad enzimática se calculo dividiendo la cantidad de  $\mu\text{mol}$  ácidos producidos entre el tiempo (min.) donde la curva deja de ser lineal, para una cantidad de enzima utilizada en (mg.).

$$\text{Unidad enzimática (U)} = \frac{1330 (\mu\text{mol ácidos prod.})}{45 (\text{min.})} = 29.55 \text{ U}$$

$$\text{Actividad enzimática (U/mg)} = \frac{29.55 (\text{U})}{0.01 \text{ gr.}} = 2.955 (\text{U/mg})$$

La enzima Lipasa de Cándida rugosa presento una actividad enzimática de 2.955(U/mg), en un tiempo máximo de 45 min.

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

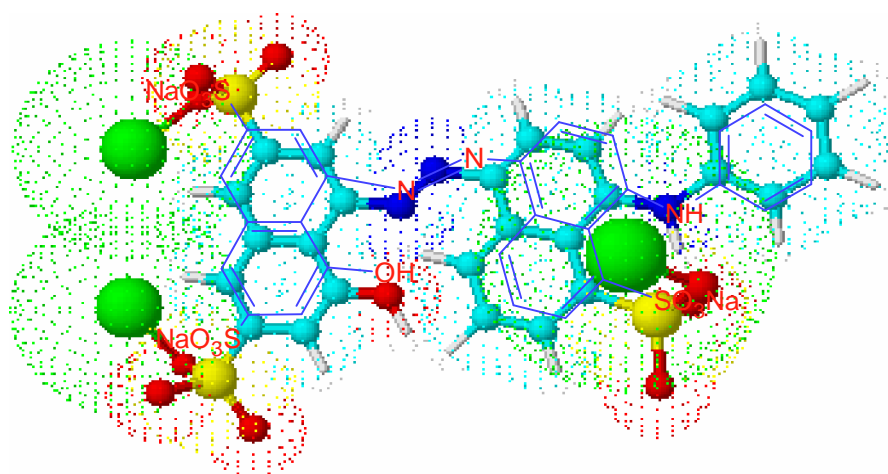
*Bach. Maharani Puccier Luna*

## Anexo A3

### Detección de Proteínas totales por espectrofotometría

#### Fundamento

Los polipéptidos (la mínima unidad de reacción es el tripéptido) reaccionan con una disolución diluida de sulfato cprico en medio fuertemente alcalino, mostrando una coloración violeta característica. Cuya intensidad es proporcional a la cantidad de proteínas totales.



#### Preparación de la curva de Calibrado

Para construir la curva de calibrado se determinó la absorbancia de cada solución de concentración conocida de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente (3.2.3.1). En los resultados presentados a continuación, tabla A3.1, se determinó su promedio y se graficó Absorbancia vs concentración ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), los cuales fueron sometidos a regresión lineal mostrándose en la Fig. A3.1

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

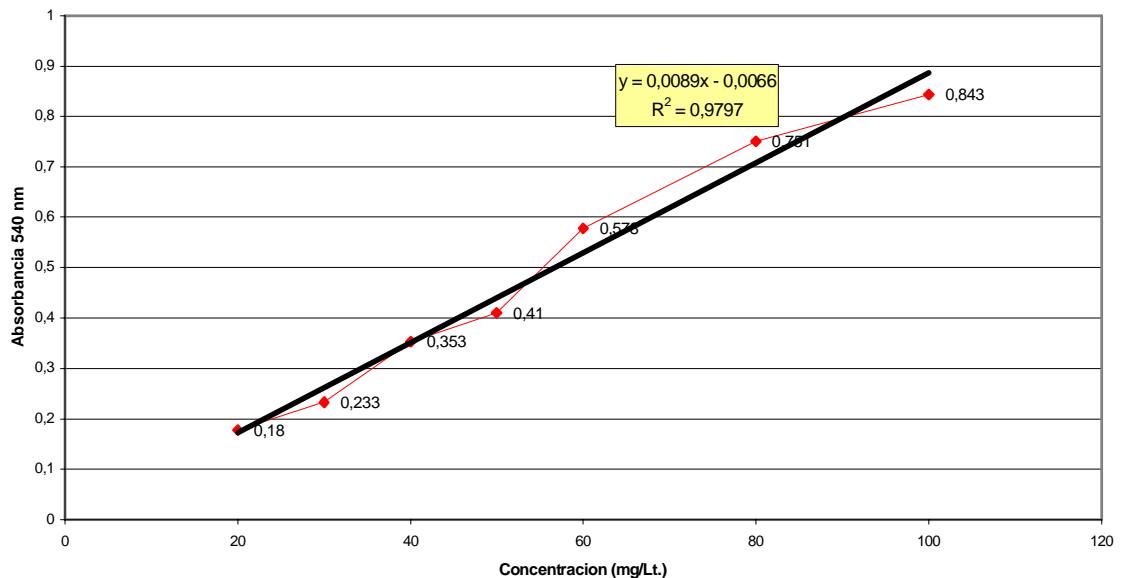
*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

Tabla A3.1. Datos experimentales de la curva de calibrado para la determinaci3n de proteínas

Disoluci3n madre (ml)	Agua destilada (ml)	Concentraci3n de proteína(mg/ml) x 1000(mg/L <sup>-1</sup> )	Bradford (ml)	Absorbancia Promedio (de 3 repet.)
0.5	0	0.5(0.1)/0.5 = 0.1 = 100	5	0.843
0.4	0.1	0.4(0.1)/0.5 = 0.08 = 80	5	0.751
0.3	0.2	0.3(0.1)/0.5 = 0.06 = 60	5	0.578
0.25	0.25	0.25(0.1)/0.5 = 0.05 = 50	5	0.410
0.20	0.30	0.20(0.1)/0.5 = 0.04 = 40	5	0.353
0.15	0.35	0.15(0.1)/0.5 = 0.03 = 30	5	0.233
0.10	0.40	0.1(0.1)/0.5 = 0.02 = 20	5	0.180
blanco	0.50	0.0(0.1)/0.5 = 0.0 = 0	5	0

Figura. A3.1. Curva de calibrado para la determinaci3n de proteínas por el método Bradford.



Donde:  $y = 0.0089x - 0.0066$                        $y$ : Absorbancia 540 nm

$R^2 = 0.9797$      $y \in [0.18, 0.843]$

$x$  : Concentraci3n de proteína (mg.L<sup>-1</sup>)



**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

Resultados con la muestra:

Valor promedio de absorbancia de la enzima lipasa de *Candida rugosa* 0.104

Reemplazando este valor en la siguiente ecuación:

$$\text{Absorbancia} = 0.0089 [\text{Proteína}] (\text{mg./L}) - 0.0066 (r^2 = 0.9797)$$

$$[\text{Proteína}] = 12.426 (\text{mg/ L})$$

La muestra fue concentración (0.1 mg/ml), el porcentaje de proteína es.

$$\% \text{ proteína} = \frac{12.426 (\text{mg/ L})}{0.1 (\text{mg/ml}) * 1000 (\text{ml/ L})} \times 100 = 12.426 \%$$

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

**ANEXO B**

**ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL  
DISEÑO EXPERIMENTAL**

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

Anexo B1. Análisis estadístico de la Influencia de las enzimas en la Obtención del Colorante de P prika.

Cuadro B1.1 Medida de Grado Asta en el P prika tratado enzimaticamente

Enzima	Repeticiones		
	R1	R2	R3
S/enzima	182.911	178.893	181.65
Celulasa	170.480	179.452	186.93
Lipasa	213.848	224.316	217.87
Proteasa	198.893	207.866	204.870

Factor de estudio = Grados Asta

Cuadro B1.2. Análisis de Varianza para determinar la influencia de las enzimas en la obtención del Colorante de páprika

Variación	G. L	S. C	C. M	F cal.	F tab.	Hipótesis
Enzima	3	3260.784	1086.928	46.880	4.76	Variación
Repeticiones	2	102.524	51.257	2.21	5.14	No hay variación
Error	6	139.112	23.185			
Total	11	3502.410				

Variable dependiente = Grados Asta

$\alpha = 0.05$

F cal. > F tab.  $\longrightarrow$  Diferencias significativas (Variación)

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

Cuadro B1.3. Prueba de Comparación de medias de Duncan

Enzima Comercial	Promedio	Prueba de Duncan
Lipasa	218.678	A
Proteasa	203.876	B
s/enzima	181.151	C
Celulasa	178.954	C

$\alpha = 0.05,$  G. L = 6

Diferencia de las letras entre tratamientos indica que existen diferencias significativas entre ellos.

A > B > C

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
(*Capsicum annuum*)

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

Anexo B2.1. Analisis estadístico de la influencia de la concentración de enzimas en la obtención del colorante de páprika.

Cuadro B1.1 Medida de Grado Asta en el Pprika tratado enzimáticamente

Concentración	Repeticiones		
	R1	R2	R3
C = 0.1 %	213.91	216.88	214.45
C = 0.25 %	217.86	219.06	220.33
C = 0.5 %	234.11	233.93	233.44
C = 1.0 %	237.29	236.13	234.08

Factor de estudio = Grados Asta

Cuadro B2.2. Analisis de Varianza para determinar la influencia de la concentración de enzimas en la obtención del colorante de páprika

Variación	G. L	S. C	C. M	F cal.	F tab.	Hipótesis
Concentración	3	975.090	325.030	166.596	4.76	Variación
Repeticiones	2	1.8717	0.935	0.479	5.14	No hay variación
Error	6	11.7098	1.951			
Total	11	988.672				

Variable dependiente = Grados Asta

$\alpha = 0.05$

F cal. > F tab.  $\longrightarrow$  Diferencias significativas (Variación)

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

Cuadro B2.3. Prueba de Comparación de medias de Duncan

Concentración	Promedio	Prueba de Duncan
C = 1.0 %	235.83	A
C = 0.5 %	233.826	A
C = 0.25 %	219.083	B
C = 0.1 %	215.08	C

$\alpha = 0.05,$                       G. L = 6

Diferencia de las letras entre tratamientos indica que existen diferencias significativas entre ellos.

A > B > C

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika**  
**(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

Anexo B3. Analisis estadístico de la Influencia del grado de Dilución en la Obtención del Colorante de Pprika.

Cuadro B3.1 Medida de Grado Asta en el Pprika tratado enzimaticamente

Dilución	Repeticiones		
	R1	R2	R3
1 : 15	230.46	235.83	238.09
1: 10	226.01	236.98	237.92
1 : 5	220.84	231.12	236.89

Factor de estudio = Grados Asta

Cuadro B3.2. Analisis de Varianza para determinar la influencia del grado de Dilución en la obtención del Colorante de páprika

Variación	G. L	S. C	C. M	F cal.	F tab.	Hipótesis
Dilución	2	228.415	114.207	17.007	6.94	Variación
Repeticiones	2	39.624	19.812	2.950	6.94	No hay variación
Error	4	26.86	6.715			
Total	8	294.899				

Variable dependiente = Grados Asta

$\alpha = 0.05$

F cal. > F tab.  $\longrightarrow$  Diferencias significativas (Variación)

**Obtención enzimática de colorante natural a partir de páprika  
(*Capsicum annuum*)**

*Bach. Sandro Bustamante Munives*

*Bach. Maharani Puccier Luna*

Cuadro B3.3. Prueba de Comparación de medias de Duncan

Dilución	Promedio	Prueba de Duncan
1 : 15	237.633	A
1 : 10	234.64	A
1 : 5	225.77	B

$\alpha = 0.05,$  G. L = 4

Diferencia de las letras entre tratamientos indica que existen diferencias significativas entre ellos.

A > B