

Cinética y extracción de la bromelina obtenida a partir de la piña (*Ananas comosus*) proveniente de Lebrija-Santander

Kinetics and extraction of the bromelain obtained from the pineapple (*Ananas comosus*) from Lebrija, Santander

Clavijo Diego¹, Portilla M. Maghdriel ², Quijano P. Alfonso^{1*}

¹ *Facultad de Ciencias Básicas, Programa de Química, Universidad de Pamplona, Km 1 Vía Bucaramanga, Pamplona, Norte de Santander, Colombia*

² *Facultad de Ingenierías y Arquitectura, Programa Ingeniería de Alimentos, Universidad de Pamplona, Km 1 Vía Bucaramanga, Pamplona, Norte de Santander, Colombia*

Recibido 29 de Octubre 2011; aceptado 8 de noviembre de 2011

RESUMEN

*El objetivo del proyecto es extraer bromelina de la piña perole-
ra y estudiar su comportamiento cinético. La bromelina es una
glicoproteína del grupo de las cisteíno proteasas, actúa sobre los
aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas. En la industria
alimentari, se utiliza como ablandador de carne; hidroliza proteínas
solubles de la cerveza. La pulpa de la fruta se llevó a refrigeración,
agregando benzoato de sodio, se realizó la extracción con dos
solventes: etanol y acetona (75% y 50%) v/v en agua. El extracto
se centrifugó a 4000 rpm por 20 min. La mezcla total se dejó en
reposo durante 50 horas manteniendo la temperatura entre 5 y
10°C y se centrifugo a 4000 rpm por 25 min, se obtuvo un precipi-
tado amarillo oscuro que se dejó secar a temperatura ambiente.
Se realizó la cuantificación de proteína, utilizando el método de
biuret. Se realizó una electroforesis para encontrar el peso mole-
cular aproximado de la proteína extraída. La eficiencia catalítica
de la bromelina se determinó usando caseína como sustrato. Se*

*Autor a quien debe dirigirse
la correspondencia. E-mail:
quijanoparra@unipamplona.edu.co

obtuvo como resultado que, la acetona, a una concentración de 75% v/v, es la más eficaz para la extracción (243,2mg) que supera aproximadamente en 100mg a la cantidad obtenida con el etanol al 50% v/v (146,0mg). El análisis electroforético muestra que el peso molecular de la bromelina es de 35000 dalton. El comportamiento cinético de la bromelina se ajusta al modelo de michaelis-menten, en el cual se determinan la v_{max} $3.38e-3$ mm/seg y el valor de k_m de $4,19e-3$ mm.

Palabras clave: agente fibrinolítico, bromelina, caseína, electroforesis.

ABSTRACT

The objective of the project is to extract the bromelain from the pineapple and study its kinetic behavior. The bromelain is a glycoprotein of the cysteine proteases group acting on the basic amino acids and proteins aromatics. In the food industry, it is used as a meat tenderizer and it hydrolyzes soluble proteins of the beer. The pulp of the fruit was cooling and adding sodium benzoate, extraction was performed with two solvents: ethanol and acetone (75% and 50%) v / v in water. The extract was centrifuged at 4000 rpm for 20 min. The total mixture was let to stand for 50 hours while maintaining the temperature between 5 and 10 ° C and it was centrifuged at 4000 rpm for 25 min, it was obtained a dark yellow precipitate that was dried at environment temperature. Quantitation was performed of the protein by using the biuret method. Electrophoresis was performed to find the approximate molecular weight of the extracted protein. The catalytic efficiency of the bromelain was determined by using casein as substrate. It was obtained as a result that the concentration of acetone to 75% v / v is the most effective for extraction (243.2 mg) that exceeds approximately 100mg to the obtained amount with the ethanol 50% v / v (146, 0mg). The electrophoretic analysis shows that the molecular weight of the bromelain is 35000 Dalton. The kinetic behavior of the bromelain fits the Michaelis-Menten model in which it is determined the v_{max} $3.38e-3$ mm / sec and the value of k_m of $4.19 e-3$ mm.

Keywords: fibrinolytic agent, bromelain, casein, electrophoresis.

INTRODUCCIÓN

El uso de enzimas como biocatalizadores es una gran opción que debe desarrollar nuestro país, disminuyendo de esta forma el atraso tecnológico en que nos encontramos en el campo de la enzimología y buscando a la vez las aplicaciones que proporcionen progreso a nivel industrial. Colombia es una de las potencias mundiales en cuanto al cultivo de piña, ya que se encuentra entre los doce países más productores de este fruto, alcanzando a producir más de 400.000 toneladas de piña en 2009 según los registros de la FAO (Carrera., J.; 2003).

Bromelina

La bromelina (Enzyme commission number: E.C. 3.4.22.32) se obtiene del jugo, de la fruta o de los tallos de la piña (*Ananas comosus*). Es una glicoproteína del grupo de las cisteíno proteasas. Actúa preferencialmente sobre los aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas. Su pH óptimo se encuentra en el rango de 5 a 8. Tiene baja tolerancia térmica. El enzima se utiliza principalmente como ablandador de carne (tiene buena actividad sobre los tendones y el tejido conectivo rico en elastina) y para hidrolizar proteínas solubles de la cerveza que pudieran precipitar y causar opacidad por el enfriamiento (Carrera., J.; 2003). Estudios de secuenciación de aminoácidos han demostrado que la bromelina debe su actividad a un grupo sulfhidrilo (-SH) propio de una cisteína-25 (Ritonja, A. *et al.*, 1989), grupo activo que se asemeja a otras cisteíno proteasas como la actinidina y la papaína (Lee, A. *et al.*, 1997). Junto con la papaína (enzima activa de la papaya), la bromelina tiene una actividad hidrolítica sobre el tejido conectivo con una

eficacia del 60%, lo que hace que estos enzimas tengan la capacidad de proporcionar un rápido ablandamiento de la carne de vacuno adulto (Ionescu., *et al.*, 2008). Según Galarza D. (2002), un extracto de corazón de la piña, tiene mayor efecto sobre el ablandamiento de carnes que extractos de cáscara y pulpa; esto puede indicar que el corazón de la piña contiene bromelina de mayor actividad enzimática que la de cualquier otra parte de la fruta. Propiedades similares le permiten actuar eficientemente sobre levaduras, lo que conlleva a que su uso se extienda a la industria panificadora (Moodie, P. 2001).

En la industria de los alimentos encontramos la aplicación más popular de la bromelina. La capacidad de la bromelina para degradar el material fibroso de los cárnicos es bien conocida. Tanto la cáscara, como la pulpa y el corazón de la piña ejercen un efecto ablandador sobre las carnes, esto es dado por supuesto por la presencia de bromelina en todo el fruto de piña (Galarza, D., 2002).

En cuanto a la industria vinícola Benucci, I. *et al.* (2010), demostraron que la bromelina estabiliza proteínas presentes en el vino blanco e impide que estas precipiten durante la fabricación de la bebida, aspecto que le confiere al producto más claridad y que puede llevar a futuras aplicaciones biotecnológicas de la bromelina en la fabricación de vinos.

Factores que afectan la velocidad de reacción

Existen varios factores que afectan directamente la velocidad de reacción de un enzima, algunos modifican el entorno químico

co del medio impidiendo que el enzima actúe con naturalidad y otras inhiben totalmente la actividad enzimática, conduciendo generalmente a la desnaturalización del enzima. Estos factores son:

- Concentración del Enzima.
- Concentración del Sustrato.
- pH.
- Temperatura.
- Presencia de inhibidores.

En el caso de la concentración de enzima, se trata de una variable que mantiene una relación inversamente proporcional con la velocidad de reacción; es decir, para una concentración dada de sustrato, entre menor concentración de enzima mayor velocidad de reacción, esto debido a que habrá menos moléculas de enzima compitiendo por el sustrato. En el caso del pH y la temperatura son

factores que desnaturalizan el enzima, puesto que cada enzima tiene unas condiciones de pH y temperatura óptimas para su funcionamiento, fuera de las cuales el funcionamiento no será el adecuado y en algunos casos será nulo (Colarossi., A., 2011).

Electroforesis

La electroforesis es un método analítico en el que se separan biomoléculas en dependencia fundamentalmente de su carga, peso molecular y estructura tridimensional y bajo la acción de un campo eléctrico. Es de destacar que a escala analítica, los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, y sirven como método de separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas, donde aportan un potente criterio de pureza.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tratamiento de la materia prima

El fruto de *Ananas comosus*, fue suministrado por Asofrutales, sede en Lebrija, Santander, Colombia. La fruta fue recibida en estado de madurez, verde y con edades entre un año y un año y medio. Estos frutos presentaron un peso de 3000 y 2590 gr., respectivamente. La fruta fue cortada, seleccionando la pulpa de la misma y desmenuzándola suavemente por medio de un macerado hasta obtener la mayor cantidad de extracto posible. Seguidamente se llevó a refrigeración (temperatura $\leq 4^{\circ}\text{C}$), agregando benzoato de sodio (CARLO ERBA REAGENTS) como conservante en relación 0,5 g por cada litro de extracto. Pasados quince

días de este tratamiento se pasó al proceso de extracción.

Proceso de extracción

La extracción del enzima se realizó siguiendo el proceso utilizado por Alonso., A. *et al.*, (2007) con algunas modificaciones. A partir del extracto de piña (*Ananas Comosus*) anteriormente tratado, se hicieron extracciones con dos solventes: etanol (CARLO ERBA REAGENTS) y acetona (RA CHEMICALS), trabajando en cada caso concentraciones de solvente de 75% y 50% v/v en agua; esto con el fin de realizar una comparación de rendimientos entre estos solventes y estas concentraciones.

Cuantificación proteica del extracto

Se realizó la cuantificación de proteína del extracto trabajado para la extracción de la misma utilizando el método de Biuret (XXI Congreso de investigación CUAM-AC Mor, 2010). Éste proceso resulta de vital importancia para tener una certeza de la cantidad de proteína presente en el extracto y calcular nuestro rendimiento durante la extracción, teniendo en cuenta la cantidad de precipitado final obtenido. El reactivo de Biuret fue fabricado por el laboratorio de sustancias y reactivos de la Universidad de Pamplona.

Electroforesis

La electroforesis realizada se llevó a cabo con el objetivo de encontrar el peso molecular aproximado de la proteína extraída, y poder realizar una comparación con el registrado en la literatura, más específicamente el reportado por Yamada, F. *et al.* (1975), el cual tiene un valor de 31000 Dalton. El procedimiento realizado fue un seguimiento de un protocolo establecido por el laboratorio de biomoléculas de la Universidad de Pamplona.

Actividad proteolítica

Se trabajó una solución de enzima con una concentración de $4,5e^{-5}$ M. Se prepararon 100mL de una solución acuosa de caseína α (MERCK CHEMICALS) al 2% en peso, la cual teniendo en cuenta el peso molecular de la caseína es aproximadamente 25.000 Dalton (Boné, J., 2005), nos daría una concentración de $8e^{-4}$ M. Lo más relevante para esta

medición es que la concentración de sustrato sea significativamente mayor que la concentración de enzima. Se preparó además una solución de buffer fosfato 0,1M pH 6 y una solución de ácido acético (CARLO ERBA REAGENTS) 1M. Se hicieron pequeñas mezclas de las soluciones de enzima y sustrato en presencia de buffer, 3mL de cada una y 1,5mL de Buffer. Se adicionó a la mezcla 3mL de la solución de ácido acético 1M con el objetivo de parar la reacción. La adición de este último componente a la primera mezcla se realizó a los 30 segundos, la segunda a los 60 segundos, y así sucesivamente cada medio minuto hasta completar cuatro minutos para un total de 8 muestras. Se usó una mezcla de caseína y buffer como blanco y se midió la absorbancia de cada una de las muestras a 280nm en un espectrofotómetro Genesys 10UV. Ya con las medidas anteriores, se determina el tiempo necesario para que la reacción alcance la velocidad máxima, éste se da cuando las medidas de absorbancia empiezan a ser constantes. Dado este tiempo, se procedió a medir la influencia de la concentración del sustrato en la reacción; para esto se trabajó la misma concentración de enzima ($4,5e^{-5}$ M), ante soluciones acuosas de caseína de concentración 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5% peso a peso. Estas medidas se hacen por supuesto, en presencia del Buffer fosfato 0,1M pH 6 y deteniendo la reacción con ácido acético 1M. Con los datos obtenidos se procede a determinar matemáticamente la velocidad de reacción y la constante de Michaelis-Menten del enzima, usando el diagrama de Michaelis y algunos métodos de linealización como Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee y Hanes-Wool.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Proceso de extracción

El extracto de piña, después de ser centrifugado por primera vez, era mezclado con el solvente de trabajo en relación volumétrica de 1:1. Con el segundo centrifugado se obtuvo el primer precipitado, el cual es descartado. Este precipitado corresponde a azúcares de bajo peso molecular que son fácilmente separados de la pulpa trabajada. Con el nuevo agregado de solvente (esta vez la relación 1:0,5 entre la mezcla y el solvente) se llevó a la conservación en frío por el tiempo indicado.

El medio frío en el cual se conservaron las soluciones favoreció la formación del precipitado final, puesto que antes de proceder al centrifugado concluyente ya se observaba un sólido en el fondo de cada recipiente. Con la última centrifugación se obtuvo el precipitado esperado, color amarillo oscuro, el cual posiblemente corresponda a la bromelina,

En la tabla 1 se muestra esquematizado la cantidad de precipitado obtenido para cada solvente trabajado en cada concentración; estas cantidades equivalen a alícuotas de extracto de 100mL.

Como se puede observar de la tabla anterior, la acetona empleada a una concentración de 75% v/v es la más eficaz para la extracción de la bromelina de la piña, produciendo una cantidad (243,2mg) que supera casi en 100mg a la cantidad obtenida con el etanol al 50% v/v (146,0mg) que significó la extracción menos eficiente.

Tabla 1

Cantidad de precipitado obtenido para cada solvente trabajado

Extracción con etanol		Extracción con cetona	
75% v/v	50% v/v	75% v/v	50% v/v
178,2mg	146,0mg	243,2mg	205,4mg
1,782mg/mL de extracto	1.460mg/mL de extracto	2,432mg/mL de extracto	2,054mg/mL de extracto

Cuantificación proteica del extracto

A continuación se muestra la figura 1 con los valores de absorbancia obtenidos para cada uno de los patrones de albúmina bovina y la curva de calibración correspondiente.

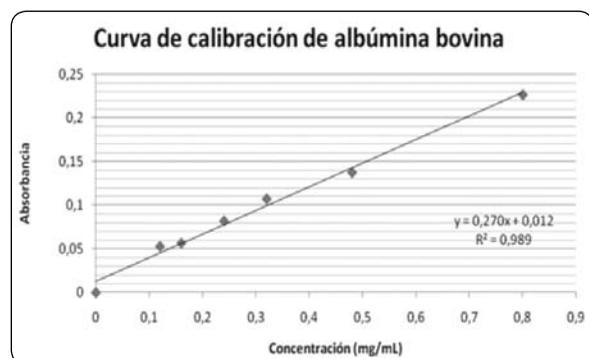


Figura 1. Curva de calibración albúmina bovina para la cuantificación

Con esta curva de calibración se obtiene la ecuación de la recta que servirá para calcular la concentración de cada muestra problema; vemos además que el coeficiente de regresión lineal (R^2) está bastante cercano a 1, por lo que la linealidad de la curva de calibración es más que aceptable.

La muestra problema, consistente en el extracto diluido se dejó 20 minutos en contacto con el reactivo de Biuret; la medida obtenida se muestra en la tabla 2.

Tabla 2
Absorbancia de muestra problema

Muestra	Tiempo en contacto con los 3ml de biuret	Absorbancia
1mL extracto + 1mL de agua	20 minutos	0,151

Según la ecuación de la recta obtenida: $y = 0,2704x + 0,0127$; para cada valor de absorbancia se tendrá una respectiva concentración. Puesto que la absorbancia es la variable correspondiente al eje “y”, despejamos la ecuación y obtenemos que $x = (y - 0,0127)/0,2704$. El valor de concentración correspondiente a la variable “x” y teniendo en cuenta el factor de dilución fue de 2,5573 y una absorbancia de 0,151.

Actividad proteolítica

Los datos obtenidos se muestran en la tabla 3, resaltando que cada muestra se midió por triplicado.

Tabla 3
Absorbancias de las mezclas sustrato-enzima

Muestra	t' de contacto sin ácido acético (seg)	Absorbancia			Abs. promed
Blanco	--	0	0	0	0
1	30	0,076	0,077	0,077	0,0766
2	60	0,085	0,084	0,085	0,0846
3	90	0,090	0,088	0,089	0,0890
4	120	0,093	0,093	0,093	0,0930
5	150	0,100	0,098	0,098	0,0986
6	180	0,098	0,098	0,098	0,0980
7	210	0,100	0,099	0,0101	0,1000
8	240	0,099	0,099	0,098	0,0986

De acuerdo a estos datos se calcula una velocidad de reacción dividiendo la absorbancia de cada caso entre el tiempo, de esta forma se halla una expresión de velocidad expresada en unidades ópticas por segundo (U.O./seg.). Estos valores de velocidad para cada caso se muestran en la tabla 4.

Tabla 4
Velocidades catalíticas del enzima en cada mezcla

Muestra	Tiempo (seg)	Abs. Promedio	Velocidad (U.O./seg)
Blanco	--	0	0
1	30	0,0766	$2,55e^{-3}$
2	60	0,0846	$1,41e^{-3}$
3	90	0,0890	$9,89e^{-4}$
4	120	0,0930	$7,75e^{-4}$
5	150	0,0986	$6,57e^{-4}$
6	180	0,0980	$5,40e^{-4}$
7	210	0,1000	$4,76e^{-4}$
8	240	0,0986	$4,11e^{-4}$

En la figura 2, se muestra como las medidas de absorbancia se ven alteradas con el pasar de los segundos hasta llegar a ser constantes.

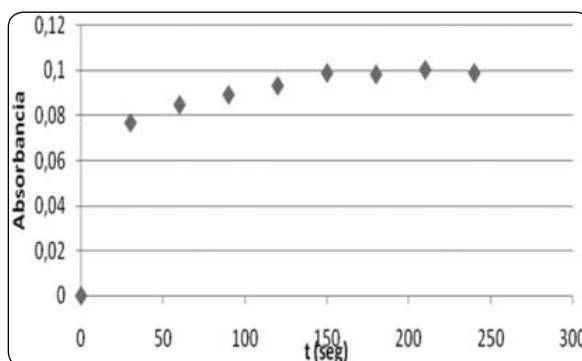


Figura 2. Variación de la absorbancia respecto al tiempo.

Como se puede apreciar, en la figura 2, a medida que el tiempo avanza la absorbancia crece hasta llegar a alcanzar un equilibrio; éste se da alrededor de los tres minutos, cuando la curva ascendente tiende a permanecer constante, es decir, cuando el enzima está alcanzando su mayor índice de actividad.

Se comprobó seguidamente el pH óptimo de la bromelina; para esto se mezclaron de nuevo 3mL de solución de caseína $8e^{-4}M$ y 3mL de solución de enzima $4,5e^{-5}M$, en presencia de 1,5mL de buffer fosfato 0,1M de pH variable. Se tomaron las medidas con

valores de pH desde 4 hasta 10. Se tomaron medidas de absorbancia a 280nm. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 5, mientras en la figura 3, se muestra la relación entre la velocidad de reacción y el pH.

Tabla 5
Velocidades de reacción del enzima a diferente pH

pH	Abs. promedio	Tiempo (seg)	Velocidad (U.O./seg)
4	0,0981	180	5,450e ⁻⁴
5	0,0988	180	5,489e ⁻⁴
6	0,0994	180	5,522e ⁻⁴
7	0,0993	180	5,516e ⁻⁴
8	0,0993	180	5,516e ⁻⁴
9	0,0988	180	5,489e ⁻⁴
10	0,0986	180	5,478e ⁻⁴

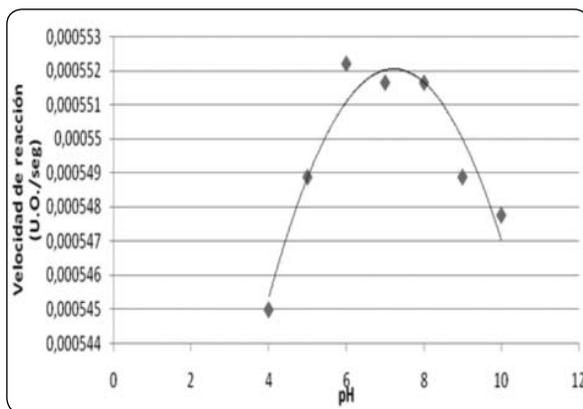


Figura 3. Dependencia de la actividad enzimática de la bromelina respecto del pH.

Como se puede ver en la figura 3, el rango de pH en el que el enzima tiene máximo desempeño es entre 6 y 8; a medida que se aleja de este rango, ya sea hacia la acidez o hacia la basicidad, su eficiencia catalítica va disminuyendo.

Tomando como base un tiempo de tres minutos y el pH 6, se toman las últimas medidas, dejando actuar el enzima a la misma concentración empleada inicialmente (4,5e⁻⁵ M), bajo la acción del mismo buffer y parando de nuevo la reacción con ácido acético 1M.

Se puede hallar la velocidad expresada en unidades ópticas por segundo dividiendo la absorbancia entre el tiempo, que para este caso equivale a 180 segundos para todas las muestras. Estas velocidades se muestran en la figura 4, donde se grafican las velocidades en función de las concentraciones molares de sustrato; esta gráfica nos llevará al diagrama completo de Michaelis-Menten:

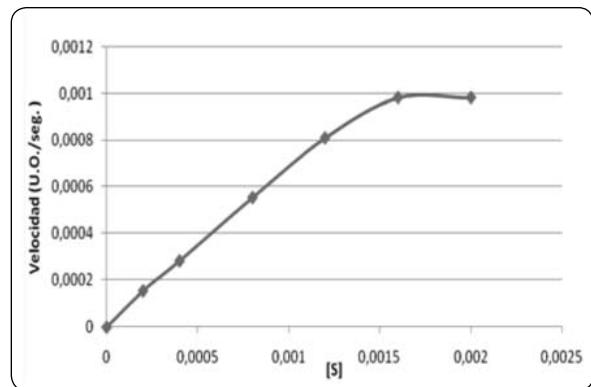


Figura 4. Velocidades de reacción en función de la concentración de sustrato.

Según la cinética de Michaelis, la interpolación al eje de las abscisas del valor correspondiente a la mitad de la velocidad máxima es equivalente a Km (Constante de Michaelis). El valor de $V_{max}/2$ equivale a 4,912e⁻⁴ U.O./seg., dato que da como resultado una constante de Michaelis con el valor de 7,962e⁻⁴M. El diagrama completo de Michaelis-Menten se muestra en la figura 5:

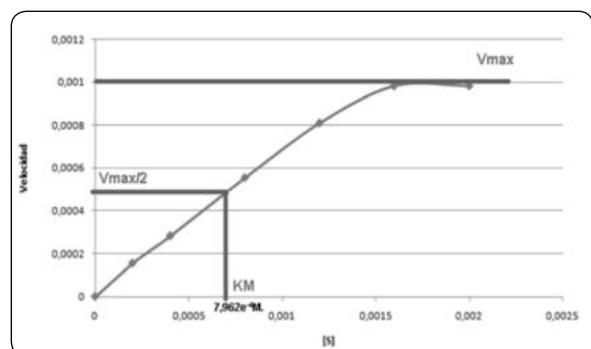


Figura 5. Diagrama de Michaelis-Menten para la Bromelina

CONCLUSIONES

De los dos solventes trabajados para la extracción, la acetona es el solvente más eficaz para este proceso. El producto obtenido tiene un peso molecular en el rango de los 30.000 y los 35.000 Dalton, valor que concuerda con el registrado en la literatura. Tal como se esperaba, la caseína resultó ser un sustrato por el cual la bromelina presenta gran afinidad. El enzima se comporta de buena

manera actuando a temperatura ambiente y pH 6. La velocidad máxima de reacción alcanzada fue de $9,83 \times 10^{-4}$ para una concentración de enzima de $4,5 \times 10^{-5}$ M, y concentraciones de sustrato (caseína) mayores de $1,6 \times 10^{-3}$ M, condiciones de concentración bajo las que el enzima se encuentra saturada, ya que la concentración de sustrato es mucho mayor que la concentración de enzima.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso, A.; Gallardo, L.; Sánchez, A.; Montalvo, C. "Extracción de bromelina a partir de residuos de piña". Universidad Politécnica de Puebla, Programa Académico en Ingeniería en Biotecnología. Puebla, Mexico. 2007.
- Benucci, I.; Liburdi, K.; Vittoria, A.; Esti, M. "Bromelain from pineapple stem in alcoholic-acidic buffers for wine application". Department of food science and technology, University of Tuscia. Food chemistry 124, Pág. 1349-1343. Julio de 2010.
- Carrera., J.E. "Production and application of industrial enzymes". Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad del Cauca, Popayán. Febrero de 2003.
- Carvajal., L.M. "Producción, transformación y comercialización. Pulpas de frutas industriales". Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Diciembre del 2000.
- Colarossi, A. "Enzimas". Universidad Peruana Cayetano Heredia. Departamento de bioquímica, biología molecular y farmacológica. Disponible en <http://www.upch.edu.pe>. Citado el 28/12/2011.
- Faostat. Base de datos estadísticos de la FAO (Food and Agriculture Organization). Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. Disponible en <http://faostat.fao.org>. Citado el 27/12/2011.
- Fenneman, O. "Química de los alimentos". 2ª Edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 2000.
- Galarza., D.F.; "Efecto ablandador de extractos de cascara, pulpa y corazón de piña en el lomo (*Longissimus toracis*) y la mano de piedra (*Semitendinosus*) de res". Zamorano. Honduras. Abril de 2002.
- García, H. "Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia". Laboratorios Beterá. 2000.
- Ionescu., A; Aprodu., I; Pascaru., G. "Effect of papain and bromelin on muscle and collagen proteins in beef meat". The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati. Fascicle VI – Food Technology, New Series, II (XXXI). Pag. 9-16. Julio de 2008.
- Lee, K.; Albee, K.; Bernasconi, R.; Edmunds, T.; "Complete amino acid sequence of ananain and a comparison with stem bromelain and other plant cysteine proteases". Biochemical Journal 327. Pag. 199-202. 1997.
- Lopez Lago, I.; Díaz, J.; Merino DE Caceres, F. "La bromelina: una proteasa de interés comercial". Sociedad Mexicana de nutrición. Ciencia y tecnología alimentaria, Vol. 1, número 002, Pág. 17-22. Reynosa, México, 1996.
- Moodie, P.; "Enzimas Tradicionales para la Industria Panificadora". American Institute of Baking (AIB) de Manhattan, Kansas. 2001.
- Morales, I. "Electroforesis". Universidad nacional autónoma de México. Disponible en <http://depa.pquim.unam.mx>. Citado el 20/01/2012.
- OIRSA. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria. "Manual técnico. Buenas prácticas de cultivo en piña". Panamá. octubre de 1999.
- Oliveira, L. "Os avancos do uso da bromelina na área de alimentacao e saúde". Departamento de economía doméstica da universidade federal do Rio de Janeiro. Alimentos e nutricao, Vol. 12, Pág. 215-226. Sao Paulo, Brasil, 2001.

Stryer, L.; Tymoczko, J; Berg, M. “Bioquímica”. 6ª Edición. Editorial Reverté S.A. 2008.

Wabiszczewicz. A. C.; “Análise de viabilidade económica de um processo de extração e purificação da Bromelina do abacaxi”. Tesis de grado UNICAMP. Facultad de Ingeniería Química. Universidade estatal de Campinas. São Paulo. Diciembre de 2005.

XXI Congreso de Investigación Cuam-Acmor. “Extracción, cuantificación, identificación y determinación de la

actividad enzimática de la bromelina contenida en el tallo del cultivo de Ananas comosus, comúnmente conocido como piña”. Centro Universitario Anglo Mexicano (CUAM) y Academia de ciencias de Morelos. 2010.

Yamada, F.; Takahashi, N.; Murach, T. “Purification and Characterization of a Proteinase from Pineapple Fruit, Fruit Bromelain”. Department of Biochemistry, School of Medicine, Nagoya City University.