

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y TEXTIL



**“AISLAMIENTO DE LOS PIGMENTOS CAROTENOIDES
APARTIR DE LA OLEORRESINA DE PAPRIKA (*Capsicum
Annuum*), POR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA”**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO QUÍMICO

PRESENTADO POR:

**BRAVO VENEGAS JULISSA KARINA
FARJE JURADO CINTHYA**

LIMA – PERÚ

2010

INDICE

INTRODUCCION

I MARCO TEORICO	1
1.1 Materia prima.	1
1.1.1 Origen.	1
1.1.2 Características taxonómicas y morfológicas.	1
1.1.3 Clasificación.	4
1.1.4 Condiciones climatológicas para el cultivo.	6
1.1.5 Siembra.	6
1.1.6 Fertilización Química.	7
1.1.7 Riegos.	9
1.1.8 Aporque-deshierbo.	9
1.1.9 Cosecha.	9
1.1.10 Producción nacional.	10
1.2 Oleorresina.	15
1.2.1 Composición.	16
1.2.2 Propiedades físico químicas.	17
1.2.3 Aplicaciones.	17
1.3 Pigmentos carotenoides.	18
1.3.1 Clases.	18
1.3.2 Propiedades físicas.	21
1.3.3 Identificación.	22
1.4 Enzimas.	24
1.4.1 Naturaleza enzimática	25
1.4.2 Mecanismo de acción de las enzimas.	26
1.4.3 Factores que afectan la actividad de las enzimas.	28
1.4.4 Nomenclatura y clasificación de las enzimas.	33

II CARACTERIZACION DE LA PAPRIKA Y METODOLOGIA DE SEPARACION DE LOS PIGMENTOS	35
2.1 Caracterización de la paprika.	35
2.1.1 Composición química	35
2.2 Metodología de separación de los pigmentos	38
2.2.1 Métodos alternativos.	38
2.2.2 Selección del método.	39
2.2.2.1 Equipo de extracción.	39
2.2.2.2 Descripción.	39
2.2.2.3 Diseño de experimento.	43
III DESARROLLO EXPERIMENTAL	45
3.1 Selección y preparación de la materia prima.	45
3.2 Extracción de la oleoresina.	46
3.2.1 Extracción sólido-líquido.	46
3.2.2 Concentración a vacío.	46
3.3 Caracterización de la oleoresina.	47
3.4 Separación de los pigmentos mediante una hidrólisis enzimática.	52
3.5 Análisis cuantitativo de la separación enzimática.	58
3.6 Separación de los pigmentos mediante la saponificación con KOH_{ac} .	59
3.7 Análisis cuantitativo de la separación por saponificación con KOH_{ac} .	62
IV RESULTADOS DE LA EVALUACION DE LOS PIGMENTOS	
CAROTENOIDES.	64
4.1 Método de análisis de los pigmentos.	64
4.2 Evaluación de los pigmentos por el método de la Separación Enzimática.	64
4.2.1 Análisis del Tiempo de reacción de la Hidrólisis.	64
4.2.2 Efecto de la concentración de enzima	68
4.3 Evaluación de los pigmentos por el método de Separación por Saponificación con KOH_{ac} .	72
4.3.1 Efecto de la concentración de KOH_{ac} .	72

4.4 Comparación de la separación enzimática con la separación por saponificación con KOH _{ac} 1N.	74
4.5 Sugerencia final	75
V COSTOS DE PROCESAMIENTO A NI VEL PILOTO	77
VI CONCLUSIONES	82
VII REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	84
APENDICE A	85
APENDICE B	85
APENDICE C	87
APENDICE D	88

RESUMEN

La páprika constituye un ingrediente alimentario muy importante; sus derivados pueden ser encontrados como colorantes de gran variedad de productos, entre los cuales se pueden incluir derivados cárnicos, aderezos y salsas, embutidos, conservas, bebidas refrescantes, etc., además de tener aplicación en la industria cosmética y farmacéutica.

La investigación trata de extraer los pigmentos carotenoides de las bayas del pimiento rojo dulce, *Capsicum annuum L.*, de la variedad Papriking, debido principalmente a su alto contenido colorante y casi ninguna pungencia, siendo principalmente cultivadas en Arequipa, Lima, Ancash, Lambayeque, Ica, Tacna y Piura.

El desarrollo de la investigación consiste primeramente en extraer los pigmentos mediante una técnica de separación sólido-líquido a reflujo, obteniendo una oleorresina, para posteriormente eliminar la grasa con un tratamiento enzimático y finalmente mediante una extracción con solvente aislar totalmente los carotenoides, entre ellos la capsantina y capsorrubina, que están en mayor proporción.

Para la obtención de la oleorresina, el solvente usado en la extracción sólido-líquido es alcohol rectificado al 96% y dicha extracción se realiza a las siguientes condiciones:

- Relación masa:solvente: 1:5
- Tiempo de extracción: 2 horas.
- Número de extracciones: 3
- Temperatura de reflujo: 98-100°C

Luego de obtener el extracto, éste se concentra en un rotavapor Bushi RE 111 a 50°C para evitar pérdidas por oxidación de los pigmentos carotenoides, obteniendo así la oleorresina.

Para la separación de los pigmentos hay una primera etapa, que es la separación por reacción de hidrólisis enzimática de los pigmentos esterificados con el agua, de ésta manera se separa la grasa de los pigmentos obteniendo éstos con un mejor nivel de color y libres de grasa. Las variables a ser evaluadas en función a la reducción de grasa son:

- Dosis de lipasa diluida 0,1ml enzima / ml solución: 5, 10,15, 20, 30 ml.
- Tiempos de agitación: 10, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240 minutos.

La segunda etapa trata del aislamiento de los pigmentos mediante la extracción con cloruro de metileno, donde al extracto obtenido se le evapora el solvente para así obtener el producto final, al que se le hace un análisis cuantitativo para la evaluación del nivel de color de los pigmentos; éste análisis se realiza mediante una espectrofotometría UV-VIS en un rango de longitud de onda de 400-520 nm.

Asimismo se desarrolla y compara la separación de los pigmentos con el método de saponificación con KOH_{ac} , método que resulta no beneficioso en comparación a la hidrólisis enzimática, ya que toma mucho más tiempo para lograr que los pigmentos que se encuentran como ácidos esterificados, pasen a su estado libre y obtengan un mejor nivel de coloración. Además otra de las ventajas del método de hidrólisis enzimática es el de ser beneficioso para el medio ambiente ya que la lipasa usada es biodegradable.

INTRODUCCION

La primera característica que es notada en los alimentos es su color, siendo ésta la que predetermina nuestra expectativa acerca del sabor y calidad de éstos. A pesar de que hay materias primas para los alimentos procesados que poseen su propio color, a veces es necesario añadir al producto un color adicional ya sea para reforzar un color existente, asegurar la uniformidad del color, restaurar su apariencia original o para dar color a ciertos alimentos que de otro modo serían incoloros.

En la rama alimenticia esto ha provocado que los colorantes naturales reemplacen a los artificiales con el fin de hacer más apetecible su apariencia sin causar efectos adversos para la salud humana, lo que permite a los colorantes naturales competir con éxito con los de origen químico, existiendo amplias perspectivas para productos regionales con alto contenido de compuestos colorantes.

Los carotenoides y los extractos que contienen carotenoides han sido ampliamente usados por décadas como colorantes en los alimentos, por lo que se han estado haciendo estudios para la separación de éstos carotenoides contenidos en diversos vegetales, tales como el achiote, zanahoria, azafrán, tomate y páprika.

Olga Lock de Ugáz y Alberto Plaza Parra (1997), hicieron estudios de la oleorresina de páprika, con respecto a la optimización del método de obtención y su caracterización (Publicado en el Boletín de la Sociedad Química del Perú).

Asimismo existe la United States Patent Office (1974), donde Ralph F. Maroushek estudió el proceso de extracción de las xantofilas de los pétalos de marigold.

La importancia de separar los pigmentos carotenoides de la páprika reside en las propiedades antioxidantes de dichos pigmentos, por lo que ayuda al organismo a liberarse de los radicales libres y ejerce fundamentalmente una función anticancerígena al inhibir el crecimiento de las células cancerosas.

CAPITULO I: MARCO TEORICO

1.1 Materia prima (*Capsicum Annuum*)

1.1.1 Origen

El nombre Párika tiene aparentemente su origen en la palabra Greco-Latina *Peperi-Piper*. Presumiblemente en el sur Eslavo gradualmente fue cambiando de nombre a Peperke para finalmente llegar a Párika. Kardos (1897) menciona que Párika obtiene su nombre botánico (*Capsicum*) de la palabra griega Kapso, Kaptein (picar, devorar) y además Kapsakes (vaina, cápsula).

América es considerada el centro de origen de la párika. De Candolle (1894) indica que la párika fue sembrada en diversos lugares de Sudamérica antes del descubrimiento de América. Posteriormente fue difundido en el norte de USA, y luego del descubrimiento de América fue transferido a Europa y Asia para luego distribuirse alrededor del mundo. Hungría ha sido uno de los países que más ha desarrollado la Párika desde su aparición a mediados del siglo XVI.

Su desarrollo como un cultivo a gran escala se remonta a la época Napoleónica. Sin embargo, su cultivo ha tenido una serie de altibajos en su desarrollo, incluso la influencia de la I y II guerra mundial.

La párika es hoy en día un cultivo de importancia en la costa peruana con una gran perspectiva en el crecimiento de sus áreas para el mercado de agro exportación, como producto no perecible.

Las principales zonas de producción en el Perú son Arequipa, Lima, Ancash, Lambayeque, Ica, Tacna y Piura. A nivel mundial se exporta a España, EEUU, Hungría y México principalmente.

1.1.2 Características taxonómicas y morfológicas

La Párika pertenece:

Familia: solanácea

Género: Capsicum.

Nombre científico: Capsicum annuum L.

La páprika se asemeja más al ají que al pimiento; es una planta anual, herbácea, con hojas oscuras de color verde oscuro que alcanza una altura de 0,8 a 1,0 m. Su raíz principal es pivotante, con numerosas raíces secundarias. Su tallo tiene un crecimiento limitado y erecto, con un porte que en término medio puede variar entre 0,5-1,5 m. Cuando la planta adquiere cierta edad los tallos se lignifican ligeramente. Las hojas son glabras (sin pelos), enteras, ovales o lanceoladas, con un ápice muy pronunciado (acuminado) y un peciolo largo o poco aparente. Las flores poseen la corola blanquecina, aparecen solitarias en cada nudo y son de inserción aparentemente axilar; aparecen a mediados de verano. Sus frutos son bayas semicartilaginosas de hasta 22 cm, verdes, y a medida que maduran toman un color rojo intenso; estos contienen grandes cantidades de vitamina C, se comen crudos, cocidos o en guisos; la pulpa seca y triturada es la páprika. Las semillas, redondeadas y ligeramente reniformes, suelen tener 3-5 mm de longitud. Se insertan sobre una placenta cónica de disposición central, y son de un color amarillo pálido. Un gramo puede contener entre 150 y 200 semillas y su poder germinativo es de tres a cuatro años (Maroto 1986).

Cabe señalar también que las partes de la páprika son:

El pedúnculo, calız, base, hombro, óvulo, septa (partición), ápice, margen de calız, glándulas capsaicina, pared placentar, placenta, sitio de adherencia, lóbulo y el pericarpio; dentro del pericarpio está, el excarpio (piel), mesocarpio, endocarpio.

Estas partes de la páprika se muestran en la figura 1, de una manera más detallada.

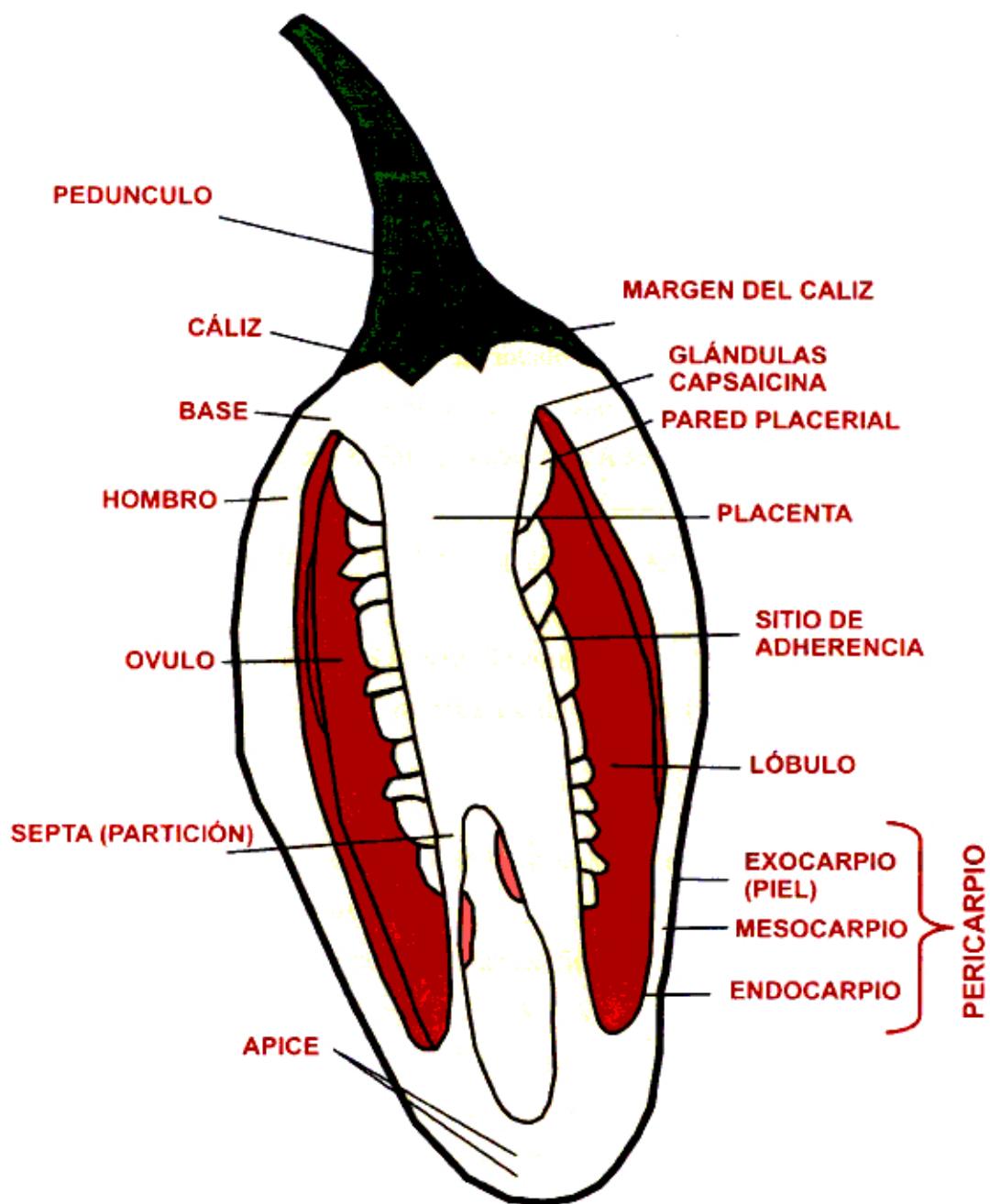


Figura 1. Partes de la páprika

1.1.3 Clasificación

Una de las características más importantes de la páprika y sus variedades es su color, y un método estándar internacional para la medida de las unidades de color es la prueba de ASTA (American Spice Trade Associaton), donde el contenido de color es analizado de la siguiente manera:

Disolver 0,07 a 0,1 gramos de muestra de páprika en 100 mililitros de acetona durante 16 horas a la oscuridad. Las soluciones o extracto previamente decantado se lleva a un espectrofotómetro para lectura de absorbancia a 450 nm de longitud de onda, determinándose las unidades ASTA según la siguiente ecuación:

$$\text{Unidades ASTA} = \frac{\text{Absorbancia} \times 164 \times F}{g}$$

Donde: F = 0,99 (Factor de corrección)

g = 0,07 a 0,1 g de muestra disuelta en 100 mililitros de acetona al 99%.

Las unidades ASTA indican color y calidad para el producto de páprika terminado.

Según Marconi (1999), la clasificación según las unidades ASTA es:

Super Grado: Mayor a 230 ASTA

Grado Uno: De 190 a 230 ASTA

Grado Dos: De 150 a 190 ASTA

Grado Tres: De 110 a 150 ASTA

Las variedades de Páprika cultivadas actualmente en Perú, son los siguientes:

- a) **PapriKing.** Que tiene una longitud promedio de 15,2 a 20,3 cm. El fruto es de paredes delgadas con un excelente color rojo, y poco picante en la mayoría de las condiciones de cultivo, la

capacidad para secado es muy buena. PapriKing ofrece niveles ASTA 220-280 u. (Petoseed (1990)).



Figura 2 PapriKing

- b) **PapriQueen.** Que produce frutos de paredes delgadas, de largo ligeramente menor que PapriKing pero de hombro mucho mas ancho, de buena capacidad de secado. Ofrece niveles 200-300 u ASTA con menos de 500 grados Scoville (Petoseed (1990)).
Grados Scoville: Medida del picor del aj.



Figura 3 PapriQueen

- c) **Sonora.** Es un pimiento tipo Anaheim que está caracterizado por excelentes cosechas de frutos grandes y uniformes. Produce frutos de (20.3 x 3.8 cm) con dos celdas lisas y de paredes gruesas. Es una planta erecta, de tamaño mediano, con madurez precoz. El fruto madura hacia el rojo oscuro y tiene muy altos niveles ASTA 300-600 u. Scoville. (Petoseed (1990)). Es excelente para procesamiento.

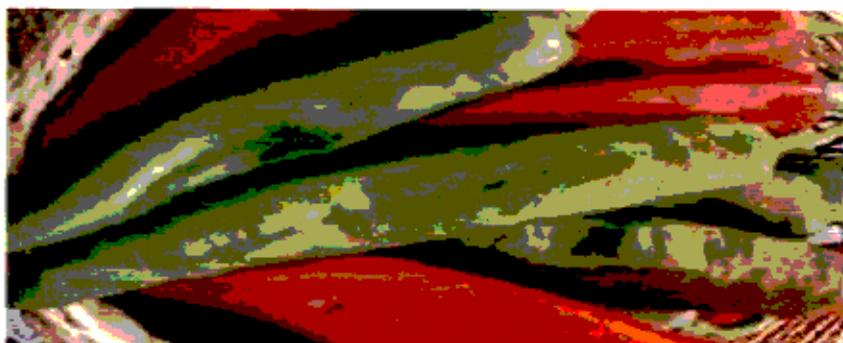


Figura 4. Sonora

1.1.4 Condiciones climatológicas para el cultivo

La páprika debe tener un promedio de 10 horas de sol, por día al año; baja humedad relativa (un promedio de 60%), además de ausencia de lluvias ya que esto facilita el secado del fruto.

El cultivo de la Páprika se desarrolla favorablemente en climas tropicales y semitropicales, en zonas donde las temperaturas están entre 18 a 25 C, puesto que si está fuera de este rango se producen frutas de mala calidad y bajo rendimiento. Se prefiere que durante la madurez de los frutos las temperaturas sean uniformes alrededor de 25 C, puesto que la intensidad de color est  directamente relacionada con la temperatura. Sus requerimientos en temperatura son fluctuantes.

1.1.5 Siembra

Siembra indirecta.

Almácigo. Los sustratos de almácigo deben ser bien preparados aplicando "Humus de Lombriz" con tierra de chacra y arena de río, en proporciones iguales. Es preferible desinfectar las camas almacigueras con algún desinfectante de suelo.

Se necesita 100 m² de almácigo por ha; la siembra se hace en hileras distanciadas a 10 cm empleándose 8 gramos de semilla por m².

Trasplante. Cuando las plantitas tienen de 5 a 6 hojas verdaderas se realiza el trasplante. La densidad de siembra depende del vigor de la planta, sistema de riego, y tipo de suelo; siendo el distanciamiento lo siguiente.

Entre plantas: 20-50 cm.

Entre surcos: 70-150 cm.

Densidad de siembra.

Es recomendable realizar la siembra a un distanciamiento entre surcos de 0,75 a 1,0 m a hilera simple y de 1,0 a 1,5 m a doble hilera, y entre plantas de 0,20 a 0,50 m, el cual depende del tipo de siembra, la fertilidad y textura del suelo. Si se realiza la siembra directa es recomendable depositar 5 semillas distanciadas una tras otra, no deben depositarse las semillas juntas por problemas de competencia.

Siembra directa.

Previo a la siembra se da un riego ligero para así corregir posible exceso o déficit de humedad en ciertas áreas del terreno, por mal nivelado del terreno.

En hoyos hechos con la lampa a un distanciamiento de 0,3 m se adiciona 5 ml de Nematicida (para matar los nematodos que dañan la planta e inhiben su crecimiento), el cual luego se mezcla con la tierra, y se deposita 3-5 semillas distanciados a 2,0 cm para así en el momento del desahije, al dejar 1 a 2 plantas más vigorosas, sus raíces no se dañen y las plantas que se extraigan puedan ser trasplantadas en otro campo previa desinfección de sus raíces.

A los 7-12 días se inicia la germinación, para evitar daño del gusano cortador de plantitas u otras plagas se debe aplicar Sevinpm y Benlate.

1.1.6 Fertilización química

De acuerdo al análisis de suelo y a los requerimientos del cultivo se realiza la fertilización a los 15 días de la siembra.

Las fuentes a emplearse son nitrato de amonio, fosfato diamónico y sulfato de potasio, en la proporción de 2,0:1,5:1,5, y asimismo fertilizantes que tengan calcio y magnesio en la proporción de 1,5:0,5.

La forma y momento de aplicación es en cuatro oportunidades que a continuación se indican, y las unidades son por hectáreas.

Consideraciones a tener en cuenta en la fertilización foliar.

La fertilización con nitrógeno, fósforo y potasio, es un complemento de la nutrición de la planta, pero no reemplaza a la fertilización del suelo.

La fertilización foliar a base de fósforo, en la fase inicial, favorece el desarrollo de raíces.

Cuadro 1: Requerimientos en la fertilización.

Nro	Momento de Aplicación	Proporción/Hectárea				
		N	P	K	Ca	Mg
1	A los 15 días después de la siembra o a los 7 días del trasplante.	0,5	1,5	1,5	0,8	0,5
2	30 días después de la siembra.	0,5			0,8	
3	60 días después de la siembra.	0,5				
4	90 días después de la siembra.	0,5				

Para favorecer el desarrollo de nuevos brotes se debe fertilizar fólidamente con nitrógeno.

En la fase de pre-floración, la fertilización foliar a base de fósforo es recomendada.

Durante el crecimiento y desarrollo de los frutos de páprika, el potasio es importante para obtener buena calidad de fruto.

1.1.7 Riegos

Es bien importante que el agua de riego sea bien aplicado, tratando de que el agua no llegue al cuello de la planta o exista exceso o déficit de humedad debido a que se tendrá problemas de pudriciones radiculares o mal desarrollo de las plantas y de los frutos. En el momento de floración no debe existir exceso o déficit de humedad puesto que se tendrá caıda de flores; la humedad en el suelo debe ser moderada.

En el momento del desarrollo del fruto el suministro de agua debe darse oportunamente, sino ocurre deformación de frutos y caıda de frutos.

1.1.8 Aporque-deshierbo

Conforme va desarrollando la planta conviene realizar el aporque de la planta, el cual consiste en que al mismo momento que se hace la eliminación de malezas y arreglo de surcos se incorpora la tierra al cuello de la planta, y así profundizar los surcos para que al momento de realizar el riego la humedad se profundice y no est superficial; con ello se induce a que las raíces profundicen y así la planta este bien vigorosa.

Los aporques deben coincidir conjuntamente con la aplicación adicional de fertilizantes.

1.1.9 Cosecha

A los 150 días se inicia la cosecha obteniéndose con un buen manejo de 25 a 30 t/ha en fresco; siendo el rendimiento en seco entre 4 a 5 t/ha.

La cosecha comercial se realiza manualmente; cuando la planta presenta frutos secos y maduros, de color rojo intenso, se inicia aproximadamente del cuarto al quinto mes después de la siembra.

El fruto se cosecha flácido (contenido de humedad de 70 a 75%), con la punta algo arrugada, lo cual nos permite un secado uniforme. Si se cosechan los frutos turgentes, éstos son propensos a pudriciones y demorar mas tiempo en el secado.

El color de la páprika va cambiando de tonalidad, de un rojo intenso en el momento de la cosecha a 75% de humedad a un rojo “concho de vino” al momento del secado, para lo cual debe llegar entre 14 y 15% de humedad.

El periodo de cosecha se extiende entre 45-60 días.

1.1.10 Producción nacional

La páprika (pimentón), según el Ministerio de Agricultura (MINAG), es ahora el producto estrella de las agro exportaciones. Este producto ocupa el primer lugar en el ranking del sector agro exportador, convirtiendo a nuestro país en el primer exportador a nivel mundial, desplazando a las partidas de espárragos y mangos que siempre encabezaron la lista.

Según indica Adex, “Es uno de los productos con mayor crecimiento y una fuente generadora de empleo y de recurso para los agricultores, los cuales están empezando a sustituir cultivos tradicionales”, según información del MINAG.

Actualmente el país cuenta con 6 mil hectáreas destinadas al cultivo de la páprika. Las zonas de mayor producción son Arequipa, Ica y Lima, en donde se concentra el 78,5% del total producido. El rendimiento promedio es de 4,6 TM por ha., siendo Piura, Apurímac e Ica las zonas con el mayor rendimiento. El nivel de asociatividad entre productores es bajo, hecho que se ha evidenciado en periodos de sobreoferta.

Como se aprecia en los cuadros adjuntos a Nivel Nacional, en todo el Perú en el año 2004 (cuadro 4) se han sembrado 3 915 hectáreas de páprika con una producción de 15 492 toneladas (cuadro 3), siendo la Región Arequipa la principal productora con 1 735 hectáreas, y con una producción de 6 111 toneladas, lo que representa el 39,4% de toda la producción Nacional. Luego le sigue Lima con 30,9%, Ica con el 17,4%, Tacna con el 11,1% y Moquegua con el 0,8%.

En el año 2007 debido a la suspensión de siembras, la producción de páprika dulce fue de 14 000 toneladas métricas (TM) entre enero y mayo, lo cual representó una cada de 40% respecto a similar período del año anterior, según informe del Instituto Peruano de Espárragos y Hortalizas IPEH, (MINAG)

El director del IPEH, Fernando Olguín, sostuvo que esta cifra es consecuencia de la cada de los precios que se dieron en el mercado internacional durante el 2006, donde el precio de venta pasó de 2,10 dólares a 80 centavos de dólar por kilo.

Ante esas circunstancias muchos agricultores generaron pérdidas, las cuales los hicieron desconfiar y, por ende, suspender para ese año la siembra del cultivo en mencn.

Olguín (2007) record que en el año 2005 la producción de páprika dulce alcanzó las 50 000 TM, mientras que en el 2006 las 35 000 TM. En el año 2007 debido a los factores ya mencionados no sobrepasó las 20 000 TM. Agreg que debido a la cada de la producción de páprika peruana, el precio de este cultivo en el mercado internacional se ha incrementado hasta un máximo histórico de 2,50 dólares por kilo.

Esto se justifica porque el Perú es el principal productor de páprika a nivel mundial, pues concentra el 50% de los envíos totales de este producto, así, al existir poca oferta, los precios suben.

En cuanto a las exportaciones de este cultivo, durante los primeros cinco meses del año 2007 el volumen exportado sumó 14 000 TM, donde el principal destino fue Estados Unidos, al concentrar el 35% del total de envíos. Le sigue España con un 25%, México con 10% y el resto a Europa con 20%.

Actualmente las empresas industriales representan el 70% de las exportaciones de páprika peruana, mientras que el 30% está compuesto por productores que exportan directamente.

De las 12 empresas industriales que exportaron este cultivo, Miski concentró el 15% de los envíos, mientras que la empresa Efada el 10% según MINAG/DGIA.



Figura 5. Evolución de los rendimientos de la páprika a nivel Nacional, según MINAG/DGIA.



Figura 6. Evolución de los precios promedio en chacra a nivel Nacional, según MINAG/DGIA.

Cuadro 2. Producción de la páprika por superficie desde el año 2001 al 2005.

Año	Superficie (ha)	Producción (TM)
2001	1 995	5 230
2002	4 688	19 380
2003	4 116	16 488
2004	5 355	35 380
2005	13 710	69 437

Fuente: Direcciones regionales de agricultura.

Elaboración: MINAG-DGIA.

Cuadro 3. Producción anual de páprika (TM), según Región, 2004.

Región	Total	%
Nacional	15 492	100
Lambayeque	64	0,4
Lima	4 784	30,9
Ica	2 691	17,4
Arequipa	6 111	39,4
Moquegua	118	0,8
Tacna	1 725	11,1

Fuente: Direcciones regionales de agricultura.

Elaboración: MINAG-DGIA.

Cuadro 4. Superficie cosechada anual de páprika, según región.
2004 (ha).

Región Nacional	Total	%
	3 915	100
Lambayeque	28	0,7
Lima	1127	28,8
Ica	525	13,4
Arequipa	1 735	44,3
Moquegua	45	1,1
Tacna	455	11,6

Fuente: Direcciones regionales de agricultura.

Elaboración: MINAG-DGIA.

Cuadro 5. Rendimiento promedio anual de páprika, según región.
(kg/ha).

Región Nacional	Promedio
	3 957
Lambayeque	2 286
Lima	4 245
Ica	5 123
Arequipa	3 522
Moquegua	2 611
Tacna	3 791

Fuente: Direcciones regionales de agricultura.

Elaboración: MINAG-DGIA.

Cuadro 6. Precio promedio anual en chacra de páprika, según región, 2004 (s./kg).

Región Nacional	Promedio
	4,88
Lambayeque	4,73
Lima	5,27
Ica	4,40
Arequipa	4,78
Moquegua	4,98
Tacna	4,92

Fuente: Direcciones regionales de agricultura.

Elaboración: MINAG-DGIA.

1.2 Oleorresina

La oleorresina de la páprika se puede definir como un extracto graso de viscosidad media que se puede obtener mediante extracción con solvente a partir de plantas especias; obtuvo su nombre de sus partes oleosas y resinosas. En cuanto a su composición, es una mezcla de sustancias en las cuales están las vitaminas solubles en grasa de las plantas y especias (Ej: oleorresina de jengibre, oleorresina de apio, etc.).

El producto obtenido con la extracción de la páprika, después de la evaporación de la solución; es la oleorresina, la cual contiene todas las sustancias solubles en grasa importantes (colorante, saborizante, y vitamina) de la membrana roja de la páprika.

Sin embargo, hay que diferenciarlo muy bien del aceite de la páprika que se halla en la pepa; no se seca y es un glicérido. Este último muy rara vez se comercializa, porque en la molienda también incluye la pepa en diversas proporciones, pues el aceite grasoso disuelve las sustancias colorantes de las membrana de la páprika y así la molienda mejora su color.

La evaluación de ciertas oleorresinas ocurre en base a su principal sustancia. En la evaluación de la oleorresina, en el caso de la páprika dulce, solo se

toma en cuenta el contenido de sustancias colorantes; su nombre es “oleorresina de páprika”

En caso de la oleorresina obtenida de la páprika picante, también se determina el picante y para diferenciarlo se le denomina “oleorresina capsica”.

El nombre de la oleorresina obtenida de la páprika de origen tropical de alto contenido picante es: “oleorezin red pepper”.

1.2.1 Composición

La oleorresina contiene las siguientes sustancias:

La parte saponificable. La integran las grasas, ceras y fosfátidos.

La parte no saponificable. Que está integrada por esterinas, carbohidratos y pigmentos.

Aparte de estos se encuentran en diversas cantidades aceites volátiles, y su proporción se mueve en gran escala. Las oleorresinas de alto contenido de aceite volátil, se llaman también bálsamos.

El contenido de sustancias volátiles de la páprika, es muy bajo, la cantidad fluctúa entre 0,1 – 0,2%.

Si bien la composición química cuantitativa de la oleorresina de páprika puede variar de acuerdo a la calidad comercial, cualitativamente siempre responde a los siguientes componentes:

Ácidos grasos. C12:0 láurico, C14:0 mirístico, C16:0 palmítico, C17:0 heptadecanoico (sólo a veces), C18:0 esteárico, C18:1 oleico, C18:2 linoleico, C18:3 linolénico.

Vitaminas. Vitamina E (α -tocoferol), cuyo contenido es variable.

Capsaicina. Su contenido en la oleorresina varía entre 0 y 0,1%.

Pigmentos carotenoides. La mayoría de estos carotenoides se encuentran esterificados, lo que los hace liposolubles. Dentro de estos grupos de sustancias se puede establecer la siguiente división:

Carotenos. En esté grupo se tiene el β -caroteno que se encuentra en un nivel de 8 al 23% del total de pigmentos.

Xantofilas. Podemos subdividirlos en dos grupos:

Rojas. Capsantina, con el 52-60% del total de pigmentos, Capsorrubina, con el 10- 18% del total de pigmentos.

Amarillas. Criptoxantina, con 3 a 5% del total, Zeaxantina con 8 – 10%, Luteína y Violaxantina, estas dos últimas en menores cantidades.

1.2.2 Propiedades físico químicas

Viscosidad: 5000 centipoise

Color: Rojo intenso.

Olor: Agradable, característico de la páprika.

Sabor: Dulce (algunas veces ligeramente pungente).

Fluidez: Fluye fácilmente.

Homogeneidad: Presenta buena homogeneidad.

Solubilidad: Ligera en aceites vegetales a temperatura ambiente (lo que les da una coloración rojo brillante y transparente).

Unidades ASTA: >2 500

Unidades de color: >100 000

Contenido de agua: Menor al 0,5%.

1.2.3 Aplicaciones

- La oleorresina de páprika se utiliza como colorante natural en productos alimenticios procesados, fundamentalmente carnes, sopas, salsas, embutidos, conservas, comidas preparadas, salchichas, etc.
- Sirve como aditivo colorante para formular alimentos enriquecidos en ácidos grasos omega-3, en dosis de 0,01% a 2%.
- Como aditivo en caramelos masticables con un suplemento de calcio en forma de sal de fosfato.
- Como componente de bebidas que pueden cambiar de color o en mezclas de micro emulsiones aromatizadas de aceite en vinagre concentradas.
- La oleorresina de páprika también se aplica en droguería, cosmética, y en la industria farmacéutica. Se usa también en la

composición de algunos medicamentos, como aceite esencial y colorante.

- Se utiliza en confituras, jaleas, mermeladas, las cuales son más apetecibles y cuando se precisa un color brillante y vivo en la fabricación de alimentos.

1.3 Pigmentos carotenoides

Los carotenoides son un grupo de compuestos solubles en lípidos. Consisten en 8 unidades de isopreno con una serie de dobles enlaces conjugados que constituyen el grupo cromóforo característico; las unidades de isopreno están unidas de tal manera que los dos grupos metilo sustituyentes más cercanos en el centro de la molécula están en posición 1,6, mientras que todos los otros grupos están en posición 1,5.

Los carotenoides están muy difundidos en la naturaleza. Los primeros se obtuvieron de la zanahoria (*Daucus carota*,) y a la mezcla obtenida se llamo carotina. Existen en las hojas (donde se hacen visibles en otoño al desaparecer la clorofila), en frutos (tomate, pimiento, naranjas, melocotones, etc.), en flores (pistilos de azafrán, pensamientos), tejidos animales (yema de huevo, caparazón de langostas y langostinos, etc.) Están también en las grasa de los animales, leche mantequilla y suero sanguíneo.

Los carotenoides pueden clasificarse como carotenos si solo están formados por átomos de carbono e hidrogeno (hidrocarburos), y como xantofilas, si contienen alguna función oxigenada.

1.3.1 Clases

β -Caroteno.

La estructura base de los carotenoides es el licopeno, que como ya se ha dicho consiste en una cadena de 8 unidades de isopreno (C40) dando un sistema conjugado de dobles enlaces, el cual es el grupo cromóforo responsable del color. La ciclación del licopeno en un extremo conduce al γ -caroteno, mientras que la ciclación en ambos extremos produce el β -caroteno. Otros isómeros del β -caroteno (α y

ϵ -caroteno) solo difieren en la posición de los dobles enlaces en las unidades cíclicas terminales.

Violaxantina.

Son carotenoides en cuya molécula existen grupos funcionales epoxi. La epoxidación provoca un acortamiento de la cadena conjugada, lo que se produce un desplazamiento en el espectro de absorción hacia longitud es de onda más corta y el color se hace mas amarillo. La violaxantina se puede obtener por oxidación cuidadosa de la zeaxantina donde el diepóxido de la zeaxantina es la violaxantina.

La violaxantina es el principal colorante del violatricolor (planta anual) y existe en la corteza de mandarina y naranja. Se encuentra también en numerosas flores amarillas.

Zeaxantina.

Xantofila dihidroxilada derivada del β -caroteno. Es el principal colorante del grano de maíz.

Criptoxantina.

Es una xantofila monohidroxilada derivada del β -caroteno. Se ha encontrado en la papaya, maíz, hojas, etc.

Capsantina.

Se encuentra junto con la capsorrubina, α y β -caroteno, zeaxantina, luteína y criptoxantina en los frutos maduros del pimiento rojo (*Capsicum annum*). La capsantina se puede considerar que es originada a partir de la zeaxantina por ruptura del doble enlace de uno de los anillos.

Capsorrubina.

La capsorrubina puede también considerarse como derivada de la zeaxantina por ruptura de los dos anillos. Es pues una dicetona.

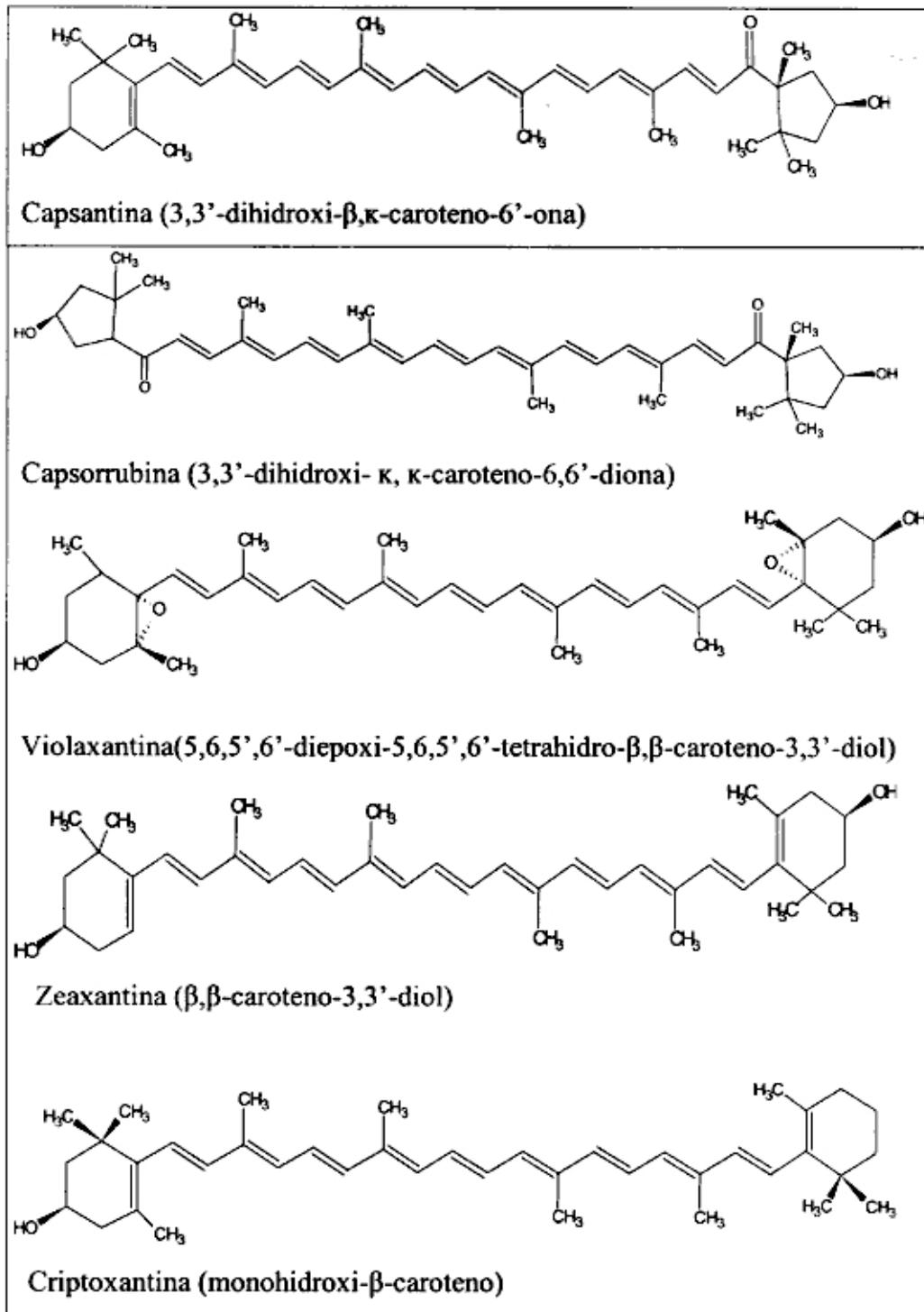


Figura 7. Diferentes tipos de Xantófilas

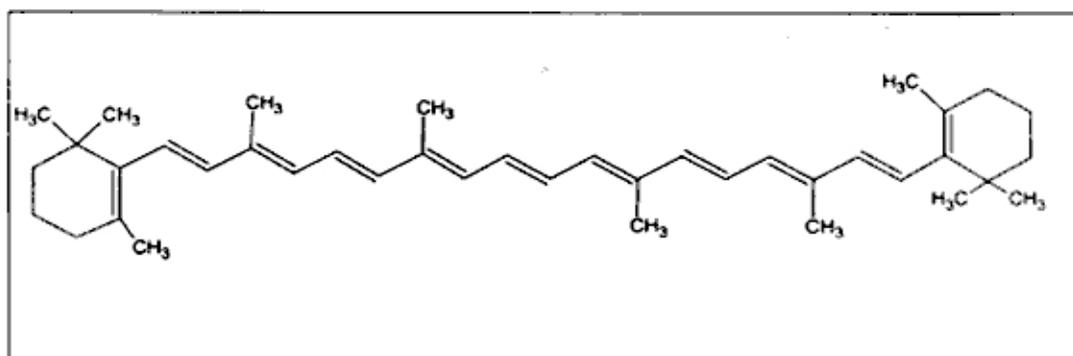


Figura 8. β -caroteno (β,β -caroteno)

1.3.2 Propiedades físicas

Los carotenoides son compuestos lipídicos, aunque existen algunas excepciones, por lo que son insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos como acetona, metanol, éter dietílico, hexano, cloroformo y piridina, entre muchos otros. Debido a su carácter hidrofóbico se encuentran normalmente en ambientes lipófilos, como en membranas, si bien su asociación con proteínas o reacciones de glicosilación les permiten también estar presentes en medios acuosos. En relación con el papel de los pigmentos carotenoides en membranas de distinta naturaleza, cabe señalar que los carotenos permanecen en el interior de las mismas, mientras que las xantófilas pueden encontrarse en otras localizaciones en las que interaccionan a través de sus grupos hidroxílicos con moléculas de fosfolípidos.

Los puntos de fusión de los carotenoides son elevados, generalmente comprendidos en el rango 130-220°C.

1.3.3 Identificación

Los espectros en la región visible de los carotenoides son muy característicos entre 400 y 500 nm, con un pico mayor alrededor de 450 nm, y usualmente dos picos menores, uno a cada lado. La posición exacta de los tres máximos varía de compuesto a compuesto y son suficientemente diferentes como para ser utilizados como medio de identificación.

Debe tenerse en cuenta algunas generalidades:

- La adición de un doble enlace carbono-carbono sin otro cambio estructural resulta en un desplazamiento del máximo de absorción a mayor longitud de onda.
- Cuando un grupo final ϕ de un carotenoide acíclico, cicla para formar un grupo final β , hay un desplazamiento del máximo de absorción a menor longitud de onda.
- La introducción de uno o más grupos hidroxilo (o metoxilo), no produce cambios notorios en el espectro de absorción
- El efecto de introducir una función carbonilo en conjugación con una cadena de polieno, causa un desplazamiento a mayores longitudes de onda y pérdida de su estructura fina, apareciendo una curva simétrica redondeada en vez del espectro general de tres picos.

Los carotenoides apolares usualmente son determinados en éter de petróleo o hexano, y aquellas de mayor polaridad como las xantófilas en Etanol. Los valores λ_{max} varían de acuerdo al solvente usado; los registrados en éter de petróleo, hexano, cloruro de metileno y etanol son casi idénticos, pero los registrados en acetona son alrededor de 4 nm., mayores, y en cloroformo o benceno 10 a 12 nm. mayores.

Para la capsantina, por ejemplo, en éter de petróleo los picos son: 450,475 y 505.

Cuadro 7. Valores de absorción en el visible de carotenoides.

Hidrocarburos	λ_{\max} (nm.) en éter de petróleo		
β -caroteno	425	450	477
γ -caroteno	437	462	494
ϵ -caroteno	416	440	470
Licopeno	444	470	502
Xantófilas			
Luteína	421	445	474
Zeaxantina	424	449	476
Violaxantina	416	448	465
β -criptoxantina	425	449	476
Capsantina	450	475	505

La figura 9 pone de relieve los cambios que, en el espectro de absorción de un carotenoide, pueden producir la distinta forma estereoquímica de uno solo de sus dobles enlaces. Así, el espectro de absorción del trans-total- β -caroteno posee dos máximos en 452-453 nm y 480-481 nm, mientras que en el 15,15'-cis- β -caroteno aparece un nuevo 'pico', característico de éste doble enlace (15,15'-cis) a 338 nm. Los otros dos máximos se encuentran a 450 y 477 nm, respectivamente. Ha habido pues un desplazamiento de los máximos hacia longitudes de onda más cortas. Los espectros UV, dan información decisiva para la caracterización de carotenoides.

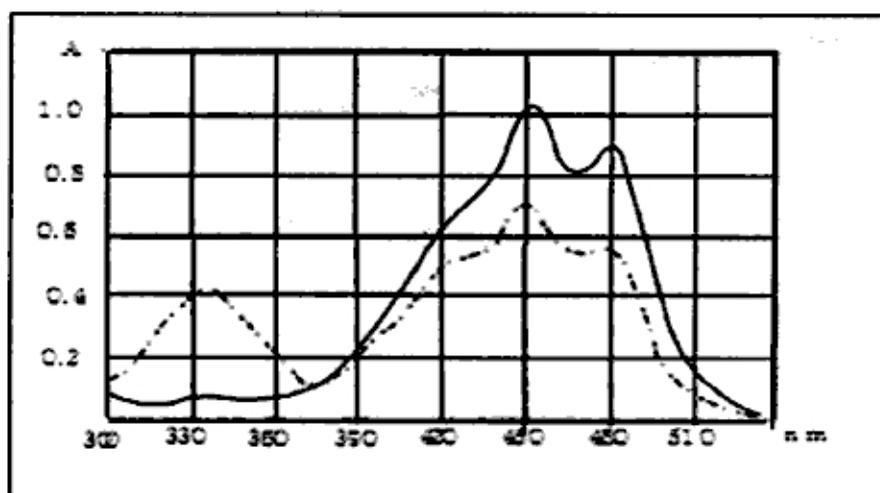


Figura 9. Espectro UV del β -caroteno.

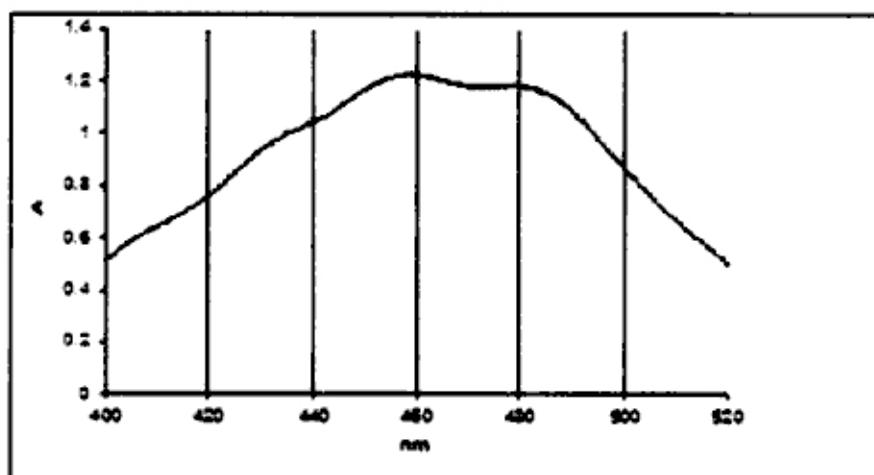


Figura 10. Espectro UV de la capsantina.

1.4 Enzimas

Las enzimas son moléculas de proteínas que actúan como catalizadores biológicos, aceleran la velocidad de las reacciones químicas dentro o fuera de las células. Las enzimas actúan sobre una sustancia llamada sustrato a la que transforman en productos.

En el interior de las células ocurren una infinidad de reacciones químicas, ya sea de síntesis o de degradación, estas reacciones son catalizadas por las distintas enzimas que se distribuyen en las células constituyendo un sistema multienzimático.

Las enzimas son proteínas con capacidad catalítica, o sea, que aceleran las reacciones químicas que se realizan en los seres vivos; y son verdaderos catalizadores por poseer las siguientes características:

Funcionan en cantidades sumamente pequeñas. Permanecen inalterables después de actuar en la reacción. No tienen ningún efecto en el equilibrio de la reacción que catalizan, sino que únicamente disminuyen los requerimientos energéticos para llevar a cabo la reacción requerida. Así tenemos por ejemplo, la descomposición enzimática de la glucosa requiere de una energía mínima de activación, en cambio, fuera de un sistema viviente es necesario suministrar una cantidad relativamente grande de energía de activación.

1.4.1 Naturaleza enzimática

Es un hecho aceptable que todas las enzimas son proteínas. James Summer, en 1926 extrae del haba, la enzima ureasa obtenida por primera vez en forma purificada y cristalizada.

Desde el punto de vista de su composición química podemos considerar dos grandes grupos de enzimas:

Enzimas que son proteínas simples. Están formadas por la unión de aminoácidos, como es el caso de la pepsina, alfa-amilasa, tripsina, ureasa, etc.

Enzimas que son proteínas conjugadas. Es decir, contienen componentes no protéicos llamados cofactores enzimáticos.

Los cofactores enzimáticos pueden ser:

- a) Iones inorgánicos. Como Mg^{2+} , Zn^{2+} , Na, K, Cu, Cl, etc.
- b) Coenzimas. Moléculas orgánicas complejas no protéicas.

En éste caso la enzima activa recibe el nombre de Holoenzima y está constituida por la fracción protéica que toma el nombre de apoenzima, unida a la fracción no proteica o cofactor.

1.4.2 Mecanismo de acción de las enzimas

Como catalizadores, las enzimas aceleran la ruptura y los procesos de formación de enlaces. Como cabe esperar, para que una molécula enzimática en particular realice ésta tarea, se tiene que incorporar íntimamente a las modificaciones que se efectúen en el sustrato.

Al iniciarse los estudios sobre las enzimas se postuló que el proceso de la reacción, la enzima (E) se une al sustrato (S) formándose un complejo enzima-sustrato (ES), que luego se desdobla liberándose la enzima y los productos de la reacción (P). La secuencia de las reacciones es como sigue:

- $(E) + (S) \rightarrow (ES)$
- $(ES) \rightarrow (E) + (P)$

Una vez formado el complejo (ES) ocurre una reacción intramolecular, la que trae como consecuencia que se altere de alguna manera la estructura electrónica del sustrato, éste hecho constituye el efecto catalítico de la enzima que determina la formación del producto.

La unión de la enzima con el sustrato para formar el complejo enzimático-sustrato ha sido explicada por Emil Fisher en 1894, mediante la teoría de la interacción de una llave con su cerradura, de tal manera que la apertura de una cerradura puede ser comparable con el efecto de la acción enzimática. Luego de producida la reacción la llave se mantiene y puede actuar nuevamente en otra cerradura del mismo tipo.

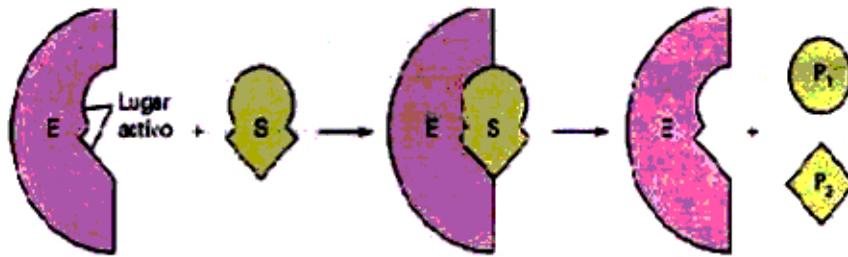


Figura 11. Modelo de llave de cerradura.

En la figura 11. Se observa que la enzima es como una especie de cerradura molecular en la que entran solo llaves moleculares en forma específica, o sea los sustratos.

La teoría llave-cerradura ha conducido a la idea del sitio activo de las enzimas.

El sitio activo, es una región determinada de la molécula enzimática que participa de manera directa en la interacción con el sustrato, es decir es una región especial que es exactamente complementaria con la forma del sustrato, y está determinada por los residuos de aminoácidos dispuestos para que las moléculas del sustrato se unan de forma adecuada con la enzima y sean objeto de las reacciones catalíticas necesarias.

Los residuos de aminoácidos que intervienen en la configuración del sitio activo durante la unión enzima-sustrato interactúan mediante enlaces iónicos e interacciones débiles como puente H, fuerza de Van der Waals, etc.

La teoría llave-cerradura implica una interacción rígida ante la enzima y el sustrato, sin embargo, se ha sugerido que la interacción en realidad no es tan rígida y que el sitio activo de la enzima tiene una cierta flexibilidad que le permite modificar su estructura para acoplarse mejor con el sustrato.

Esta nueva idea ha llevado a la concepción de la teoría del encaje inducido. Esta teoría propuesta por Daniel Koshland en 1958,

establece que la unión enzima y sustrato induce un cambio previo en la configuración de la enzima y solo después de éste cambio se forma un complejo enzima-sustrato.

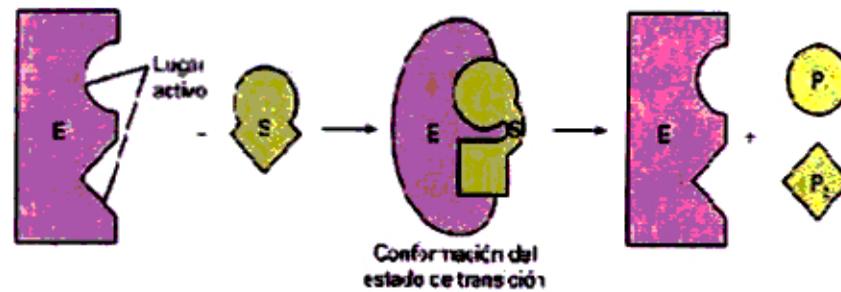


Figura 12. Modelo de ajuste inducido.

Según la figura 12. cuando el sustrato se combina con la enzima induce un cambio en la forma de ésta, que es posible porque los sitios activos de las enzimas son flexibles. Es el modelo aceptado actualmente.

1.4.3 Factores que afectan la actividad de las enzimas

Los siguientes factores tienen efectos importantes sobre la actividad de las enzimas.

- Concentración del sustrato.
- Concentración de la enzima.
- Temperatura.
- pH.
- Activadores específicos
- Inhibidores enzimáticos.
- Reguladores alostéricos.

a) **Concentración del sustrato.** La velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas depende de la concentración del sustrato (S). Si se aumenta en forma progresiva la

concentración del sustrato, manteniendo fija la concentración de la enzima, se produce al principio un aumento considerable en la velocidad de la reacción, sin embargo; si se continúa aumentando el sustrato se llega a un punto de equilibrio en el cual por más que se incremente éste la velocidad ya no se modifica, o sea que habrá llegado a su máximo.

- b) Concentración de la enzima.** La concentración de la enzima afecta la velocidad de una reacción enzimática de la misma forma a lo señalado en el caso anterior, es decir, si se mantiene constante la concentración del sustrato, a medida que se aumente la concentración de la enzima se incrementa la velocidad de la reacción, hasta llegar a un punto en el que se satura totalmente con la enzima, de tal manera que los incrementos adicionales no tendrá influencia sobre la velocidad de la reacción.

La influencia de la concentración de la enzima y del sustrato en la velocidad de una reacción guarda relación con la teoría llave cerradura, toda vez que el número de cerraduras (cantidad de sustrato) que se puede abrir dependerá del número de llaves (enzimas con la que se cuente), pero si el número de llaves con las que se cuenta, es mayor que el número de cerraduras el exceso de llaves no podrá ser utilizada.

- c) La Temperatura.** De acuerdo con la teoría de la colisión, los átomos, moléculas y iones, están en continuo movimiento, lo que permite el contacto y la colisión de los átomos entre sí, produciendo reordenamientos electrónicos. Según esto, mientras mayor sea la velocidad de las partículas mayor será la posibilidad de que ocurra una colisión.

El calor acelera el movimiento de los iones y moléculas, aumentando la frecuencia de sus contactos y por lo tanto la velocidad de la reacción química. Por lo general, cada aumento de 10°C casi siempre dobla e inclusive triplica la velocidad de la mayor parte de las reacciones.

La relación que existe entre la temperatura y la velocidad de una reacción se cumple en las reacciones tanto catalizadas como no catalizadas, aunque los sistemas enzimáticos constituyen un caso especial, pues, el calentamiento del medio aumenta la velocidad de la reacción hasta que llega a un punto en el cual el calor empieza a desnaturalizar a la enzima, y en consecuencia la velocidad de la reacción decrece hasta inactivarse. Hasta los 45°C aproximadamente se acelera la reacción, y por encima de los 45°C aparece el factor de desnaturalización, que aumenta progresivamente hasta los 55°C, temperatura en la que se desnaturaliza la enzima por ruptura de los enlaces débiles, haciendo que la molécula enzimática pierda su conformación, y con ello el sitio activo pierde también su estructura tridimensional específica, dejando de administrar la entrada del substrato.

Las enzimas presentan una temperatura óptima que generalmente se ubica en un rango comprendido entre los 30°C y 50°C. Sin embargo, existen excepciones como el caso de las enzimas de las bacterias termófilas, que tienen una temperatura óptima por encima de los 50°C.

- d) **pH.** Las enzimas por su naturaleza proteica poseen grupos químicos ionizables, que pueden ser alterados por las variaciones del pH del medio donde se encuentran. Los cambios en las cargas pueden modificar la estructura tridimensional del sitio activo, fenómeno similar que puede ocurrir con la estructura del

substrato, que también puede ser afectado por las variaciones del pH. Debido a estos factores, la actividad enzimática es afectada por las variaciones del pH. Muchas enzimas presentan un pH óptimo característico, en el cual su actividad es máxima. La mayoría de las enzimas tienen su pH óptimo entre 4 y 8. Algunas son muy resistentes a los cambios del pH. El pH del organismo y su regulación deben ser estrictamente controlados, ya que de no ser así se presentan importantes alteraciones metabólicas.

- e) **Inhibidores enzimáticos.** La actividad enzimática puede ser bloqueada por los llamados inhibidores enzimáticos. Estos inhibidores actúan en dos formas: Inhibidores competitivos e Inhibidores no competitivos.

- **Inhibidores competitivos.** En este caso, el inhibidor compite con el substrato para tener acceso al sitio activo de la enzima, debido a que su estructura química tiene gran similitud con la estructura del substrato. Un complejo de este tipo de inhibición se observa en la acción del ácido masónico, que actúa como inhibidor de la enzima deshidrogenasa succínica. El ácido succínico compite con el ácido masónico por el sitio activo. En este caso la acción inhibidora puede ser anulada mediante el aumento de la concentración del substrato, de manera que las moléculas del substrato exceden en número a las del inhibidor.

- **Inhibidores no competitivos.** El inhibidor y el substrato no compiten por un sitio de unión con la enzima, por lo general el inhibidor actúa en un sitio diferente al sitio activo de la enzima.

En este tipo de inhibición, la adición de más substrato no alivia la inhibición. Algunas enzimas que requieren iones metálicos para su activación pueden ser inhibidas de un modo competitivo por agentes capaces de unirse al metal esencial. Es el caso del cianuro, que inhibe las enzimas que dependen del Fe^{2+} o del Fe^{3+} ,

mediante la formación de complejos activos semejantes al ferrocianuro o al ferricianuro.

Los metales pesados (Ca, Hg y Ag) o sus derivados son capaces de inhibir enzimas que tienen en su estructura grupos -SH; éstos metales se combinan reversiblemente con los grupos -SH alterando la forma tridimensional de la enzima, impidiendo su actividad.

Las enzimas que necesitan Mg^{2+} , son inhibidas por el EDTA (etileno diaminotetracético de sodio) pues este compuesto forma un complejo con cationes divalente y de éste modo remueve el Mg^{2+} . La inhibición es reversible por la adición de cationes de Mg^{2+} .

f) **Activadores específicos.** Muchas enzimas son proteínas simples y no requieren de otros factores para desarrollar su actividad, sin embargo, algunas enzimas se encuentran como proenzimas o zimógenos inactivos, por ejemplo, el tripsinógeno, pepsinógeno, etc.

g) **Reguladores alostéricos.** Algunas enzimas además del sitio activo, presentan otros sitios de características relativamente específicas, por el cual interactúan con otras moléculas (metabolitos), las cuales modulan (alteran) la actividad de la enzima.

La enzima inhibida se llama enzima reguladora y el metabolito inhibidor se denomina modulador o inductor. El sustrato de la enzima reguladora es diferente en estructura del modulador, de modo que el término "alostérico" (que significa estructura diferente) se utiliza para describir la modificación que produce en una reacción enzimática un compuesto con forma diferente a la del verdadero sustrato. El espacio no catalítico se denomina

“sitio alostérico o regulador” y es tan específico para los moduladores de enzimas como lo es el sitio activo para los substratos.

En éstas enzimas el inhibidor o modulador inducen un cambio favorable o desfavorable para la interacción enzimática según el caso, La regulación, es un tipo de inhibición no competitiva, puesto que el inhibidor y el substrato no compiten, y por lo regular tienen una estructura muy diferente e interactúan con distintas partes de la enzima. La regulación alostérica ilustra la íntima relación que existe entre la estructura molecular y su función.

Cambios muy pequeños de la estructura de la enzima inducidos por un inhibidor o modulador, provocan marcados cambios en su actividad funcional.

1.4.4 Nomenclatura y clasificación de las enzimas

En 1878, Khune sugiere que el término enzima, procede del griego zimé=levadura. Sin embargo desde el tiempo de Berzelius, en 1875, se tenía conocimiento de que las células vivas producían sustancias con acción muy parecida a los catalizadores inorgánicos.

La nomenclatura de las enzimas se ha formalizado por un acuerdo internacional de la Comisión de Enzimas, sin embargo, permanece el uso general de nombres antiguos, nada informativo, como pepsina, tripsina, ptialina, cimasa, emulsina, etc, ésta es la nomenclatura no sistemática, es poco práctica, lleva a confusiones y fundamentalmente es poco informativa. Actualmente se designa a las enzimas según el nombre de los substratos sobre los que actúan, añadiéndoles la terminación asa. Por ejemplo las que actúan a nivel de proteínas se llaman proteasa, las que deshidrogenan, deshidrogenasa, las que fosforilan, fosfoforilasas, etc, ésta es la

nomenclatura y clasificación sistemática, que es químicamente informativa, descriptiva, precisa, aunque algo compleja.

De acuerdo a la Comisión Internacional se clasifica en seis grandes clases:

- **Oxidoreductasas**
- **Transferasas**
- **Hidrolasas**
- **Liasas**
- **Isomerasas**
- **Ligasa**

CAPITULO II: CARACTERIZACION DE LA PÁPRIKA Y METODOLOGIA DE SEPARACION DE LOS PIGMENTOS

2.1 Caracterización de la páprika

2.1.1 Composición química

Nuez *et al.* (1996) señala una composición de 71,3%, 20,5% y 8,2% de pericarpio, pepas y pedúnculo, respectivamente, asimismo Yamamoto (1995) encontr  un 68,5% de pericarpio, 27,5% de semillas, y un 4% de pedúnculo.

El contenido nutricional de la páprika es alto en comparación con otras hortalizas de amplio consumo, como por ejemplo el tomate. Nuez (1996) divide los componentes que determinan el valor nutricional del pimiento en dos grupos. En uno engloba a aquellos que fijan su valor biológico, sabor específico, color y uso como condimento; a este grupo pertenecen las vitaminas, los pigmentos y varios aceites volátiles. En el otro grupo se enmarca a los azúcares, las fibras, las proteínas, los minerales y a cierto tipo de ácidos orgánicos. El pimiento contiene una pequeña cantidad de aceites esenciales a los cuales debe su olor, también contiene pigmentos que ocupan un lugar muy importante en el ámbito industrial. El color de la páprika va de verde a rojo, está formado por una mezcla de pigmentos (carotenoides) biosintetizados en los cromoplastos de la vaina de la páprika (Zac International INC, 2001).

Hart y Fisher (1971) mencionan que la páprika es rica en vitaminas, entre otras destaca la vitamina C, cuyo contenido (108 mg/100 g) supera al resto de las hortalizas y frutos considerados como fuente de ésta.

capsantina de páprika tiene capacidad antioxidante y como ya se ha mencionado es uno de los pigmentos en mayor cantidad y produce la esterificación en ácidos grasos en frutas maduras.

2.2 Metodología de separación de los pigmentos

2.2.1 Métodos alternativos

La separación de los pigmentos carotenoides se realiza en dos etapas. La primera, mediante una extracción sólido – líquido a reflujo, que técnicamente es una operación de transferencia de masa, donde el solvente realiza una separación selectiva del soluto en una muestra sólida, y la segunda mediante una reacción de hidrólisis, donde, se tratará de aislar los pigmentos de la grasa. Los métodos alternativos de separación son:

- **Secado y molienda.** El secado de la páprika es un procedimiento alternativo importante porque ayuda a la molienda. Si no se realiza este procedimiento se generari  una masa pegajosa que dificultará la molienda, porque este fruto tiene grasa y humedad. El secado consiste en que la piel de la páprika pasa a un secado parcial a 65 C por dos horas aproximadamente, para luego pasar al desecador para eliminar toda la humedad posible. Luego de este procedimiento la páprika seca pasa hacia la molienda para la reducción de tamaño, y de esta manera aumentar el área de contacto entre el solvente y la páprika, y así obtener una mejor extracción sólido – líquido a reflujo

- **Extracción con solventes.** Es una extracción sólido - líquido a reflujo, donde se utiliza solvente de bajo punto de ebullición, por ejemplo, hexano, alcohol etílico, acetona, etc, para evitar la degradación del pigmento carotenoide, como la de capsantina, cuyo punto de fusión es 181 C. En esta separación se toma en consideración varios parámetros, como la relación (masa/ solvente), tiempo, temperatura de ebullición. En la industria de los procesos naturales, se utiliza el extractor tipo sohxlet, que cuenta con una

Cuadro 11. Especificación de la enzima-lipasa, nombre comercial, Lipolase 100 L, Type EX.

	Limite Mínimo	Limite Máximo
Lipolase Units KLU (unidades/g)	100	
pH a 25°C	6.5	8
Viscosidad a 25°C(cp)	-	100
Absorbancia det. 440 nm	-	1.58
Propilenglicol (%)	20	30
Cuenta total en placa (unidades/g)	-	10000

Fuente: Ficha de datos del producto novozymes, prestado por la Química Suiza S.A.

3. Aislamiento de pigmentos.

Los pigmentos de la solución hidrolizada serán aislados mediante una separación física, que consiste en la extracción con cloruro de metileno. En esta extracción de separación se forman dos capas: la capa orgánica, donde el cloruro de metileno se mezcla con los pigmentos carotenoides, y la capa acuosa.

Se usa el solvente cloruro de metileno porque es un solvente polar que tiene buena afinidad, por ejemplo para la solubilidad con los pigmentos carotenoides, y principalmente con la capsantina, que es el pigmento de mayor cantidad y el que define el color rojo carmín.

El procedimiento de aislamiento de pigmentos consiste en añadir a la pera de separación de 1litro, la solución hidrolizada y el cloruro de metileno, agitar suavemente y dejar reposar por 10 minutos aproximadamente. Se observará dos fases, la fase cloruro metilénica y la fase acuosa. Separar

la fase cloruro metilénica y realizar tres extracciones más hasta que la última extracción se observe de color tenue, luego evaporar el cloruro de metileno y el resultado es el producto final.

2.2.2.3 Diseño de experimento

Para el diseño del experimento, se tiene en cuenta lo siguiente:

- **Selección de variables a controlar.** Las variables que se controlan en el experimento son exclusivamente en la hidrólisis enzimática; la extracción sólido-líquido solo ayuda a extraer los pigmentos carotenoides de la páprika, estos están en forma de pigmentos esterificados liposolubles. Al producto de la extracción sólido-líquido se le llama oleorresina de la páprika, esta oleorresina sirve para la reacción de la hidrólisis enzimática, por lo tanto, la selección de las variables a controlar es exclusivamente para la reacción en estudio que es la Hidrólisis Enzimática.

- **Variables a controlar en la Hidrólisis enzimática.** Las variables en la hidrólisis enzimática son las alícuotas de enzima lipasa diluida de concentración 0,1 mL enzima / mL solución, y los tiempos de reacción.

- Alícuotas de lipasa diluida 0,1 mL enzima / mL solución:
5, 10,15, 20, 30 mL.

- Tiempos: 10, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240 minutos.

El cuadro 12 muestra el orden de cómo se puede trabajar las variables: dosis de enzima y tiempo de reacción.

Cuadro 12. Variables a controlar en la hidrólisis enzimática.

Alicuota de lipasa diluida de concentración 0,1 mL enzima / mL solución.	Tiempo (min)
5 mL	12, 24, 36, 48, 60, 72, 120
10 mL	15, 30, 45, 60
15 mL	15, 30, 45, 60, 120, 180, 240
20 mL	15, 30, 45, 60, 120, 180 , 240
30 mL	15, 30, 45, 60, 120, 180, 240

- **Rendimiento.** El rendimiento de la recuperación de los pigmentos carotenoides de la páprika, por hidrólisis enzimática, se calcula mediante la ecuación de rendimiento mostrada a continuación.

Producto final: masa de los pigmentos aislados después de la hidrólisis enzimática.

Oleorresina: masa necesaria para realizar la hidrólisis.

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Masa de producto final}}{\text{Masa de oleorresina}} * 100$$

CAPITULO III: DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 Selección y preparación de la materia prima

El tipo de páprika (*Capsicum annuum*) utilizada para el desarrollo corresponde a la del papriking, de estas se seleccionan aquellas con un tamaño aproximado de 16 a 18 centimetros de largo y que tengan buen color (rojo oscuro). Se adquieren en los mercados o supermercados ya que este fruto semi seco tiene demanda. Las p prikas recién adquiridas se seleccionan para eliminar las defectuosas, de poco color, irregulares, etc. En la Figura 13 se observa las p prikas seleccionadas. A las p prikas seleccionadas se les quita las semillas, solo tiene que quedar la piel. La piel de la páprika se seca, para que ayude en la molienda, ya que este fruto tiene grasa, y con la humedad se genera una masa que hace difícil la molienda. El secado consiste en que la piel de la páprika pasa a un secado parcial a 65 C por dos horas aproximadamente, para luego pasar al desecador con el objeto de eliminar toda la humedad posible. La piel de la páprika una vez seca se reduce de tamaño para aumentar el área de contacto entre el solvente y la páprika, y así obtener una mejor extracción sólido – líquido a reflujo. Esta reducción consiste en moler la piel de la páprika seca a tamaño de partícula menores a las de tamices ASTM N  40 y 30.

El Cuadro 13 muestra los resultados de humedad de la paprika usada en diferentes extracciones sólido-líquido a reflujo.



Figura 13. Selección de páprika.

Cuadro 13. Resultados de % de humedad en el secado

N° de operación	Peso de piel húmedo (g)	Peso de piel seco (g)	% Humedad	Temperatura de secado (°C)
Operación 1	134	117	12,68	65
Operación 2	137	118	13,87	65
Operación 3	122	106	13,11	65

3.2 Extracción de la oleorresina

3.2.1 Extracción sólido-líquido

La obtención de los pigmentos carotenoides de la páprika como oleorresina, consiste en una primera etapa, y es la extracción sólido-líquido a reflujo. En esta etapa se trata una muestra de 80 g de páprika molida con 400 mL de alcohol etilico al 96%, la cual se somete a ebullición a una temperatura de 98 a 100°C. El reflujo termina cuando la solución se torna de un color rojo negruzco y con un tiempo de reflujo de dos horas aproximadamente, este tiempo es contado a partir de la primera gota del solvente condensado; luego se filtra el extracto. Se realiza tres extracciones más para tratar de extraer la mayor cantidad posible de oleorresina.

En la figura 15 y figura 16, se observa el proceso de extracción a reflujo y el extracto para la obtención de la oleorresina, respectivamente.

3.2.2 Concentración a vacío

Una segunda etapa, es la concentración del extracto. En esta segunda etapa se junta los extractos obtenidos en el reflujo, para luego proceder a concentrar en un rotavaporador Bushi RE 111, como se muestra en la Figura 17, usando vacío a temperatura de 50°C, para evitar la oxidación de los pigmentos carotenoides de la páprika. Termina la concentración cuando se observa que el producto tiene

una viscosidad aproximada de 5000 centipoise y un olor que es característico de la páprika, y entonces se ha obtenido la oleorresina.

La Figura 18 y Figura 19, muestran los diagramas de flujos para la obtención de la oleorresina.

Los resultados de la extracción de la oleorresina se muestran en el Cuadro 14.

Cuadro 14. Resultados de la extracción de la oleorresina.

N� de veces de obtención de oleorresina	Peso de piel seco molido (g)	Peso de oleorresina (g)	Tiempo de reflujo (h)	Rendimiento %
Primera vez	111	33	2h30min	29,73
Segunda vez	118	45	2h30min	38,13
Tercera vez	106	37,2	3h	35,09

3.3 Caracterización de la oleorresina

La oleorresina después de la extracción a reflujo es caracterizada de la siguiente forma.

Por sus propiedades organolépticas, presenta una coloración roja negruzca, olor característico a la páprika y una viscosidad media de 5000 centipoise.

Mediante un análisis cuantitativo, se toma lectura de absorbancia con el espectrofotómetro Ultravioleta Shimadzu 1601, a una muestra de pigmento extraída de la oleorresina con cloruro de metileno. La extracción es mediante una disolución de una muestra de oleorresina con cloruro de metileno, una vez disuelta la oleorresina pasa a ser medida con el espectrofotómetro Ultravioleta en un rango de longitud de onda de 400 a 520 nm; usar como blanco cloruro de metileno y celdas de cuarzo. De la lectura de absorbancia se tiene los picos máximos de absorbancia 0,043 y longitud de onda 457, 458, 459 nm, que pertenecen a la capsantina y se

muestra en la Figura 14. Con este espectro se observa la presencia de capsantina en la oleorresina.

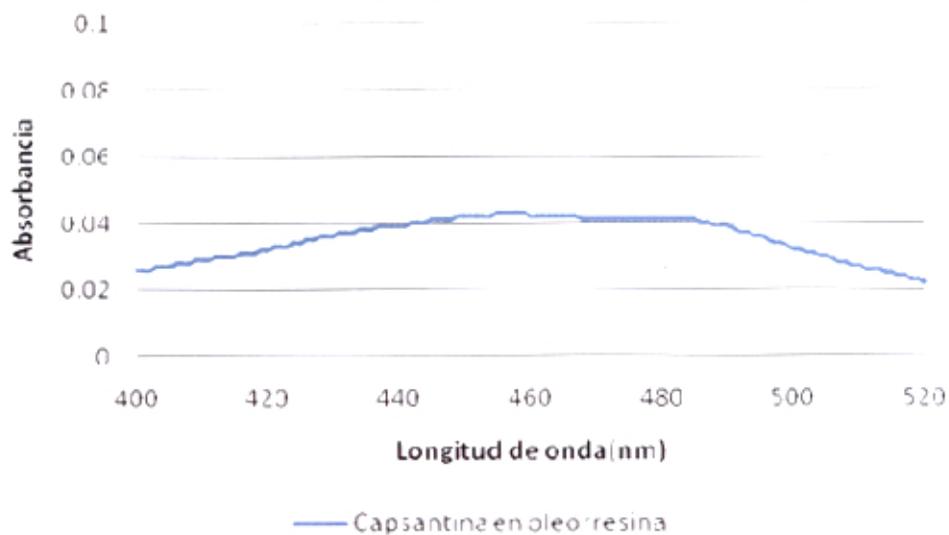


Figura 14. Capsantina presente en la oleorresina.



Figura 15. Extracción sólido-líquido a reflujo.



Figura 16. Extracto del reflujo.



Figura 17. Rotavaporador Bushi RE 111

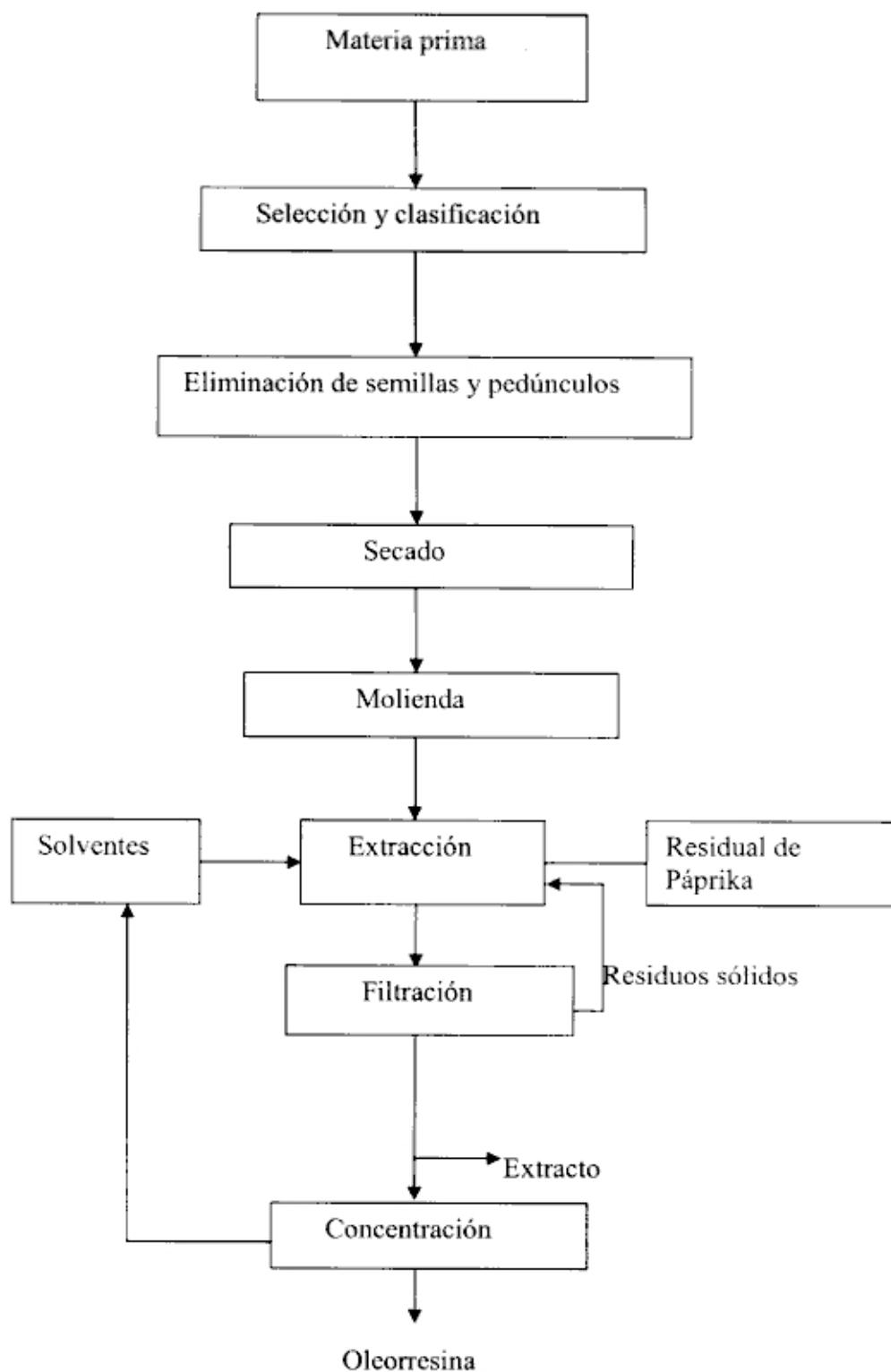


Figura 18. Diagrama de bloques para la obtención de oleorresina.

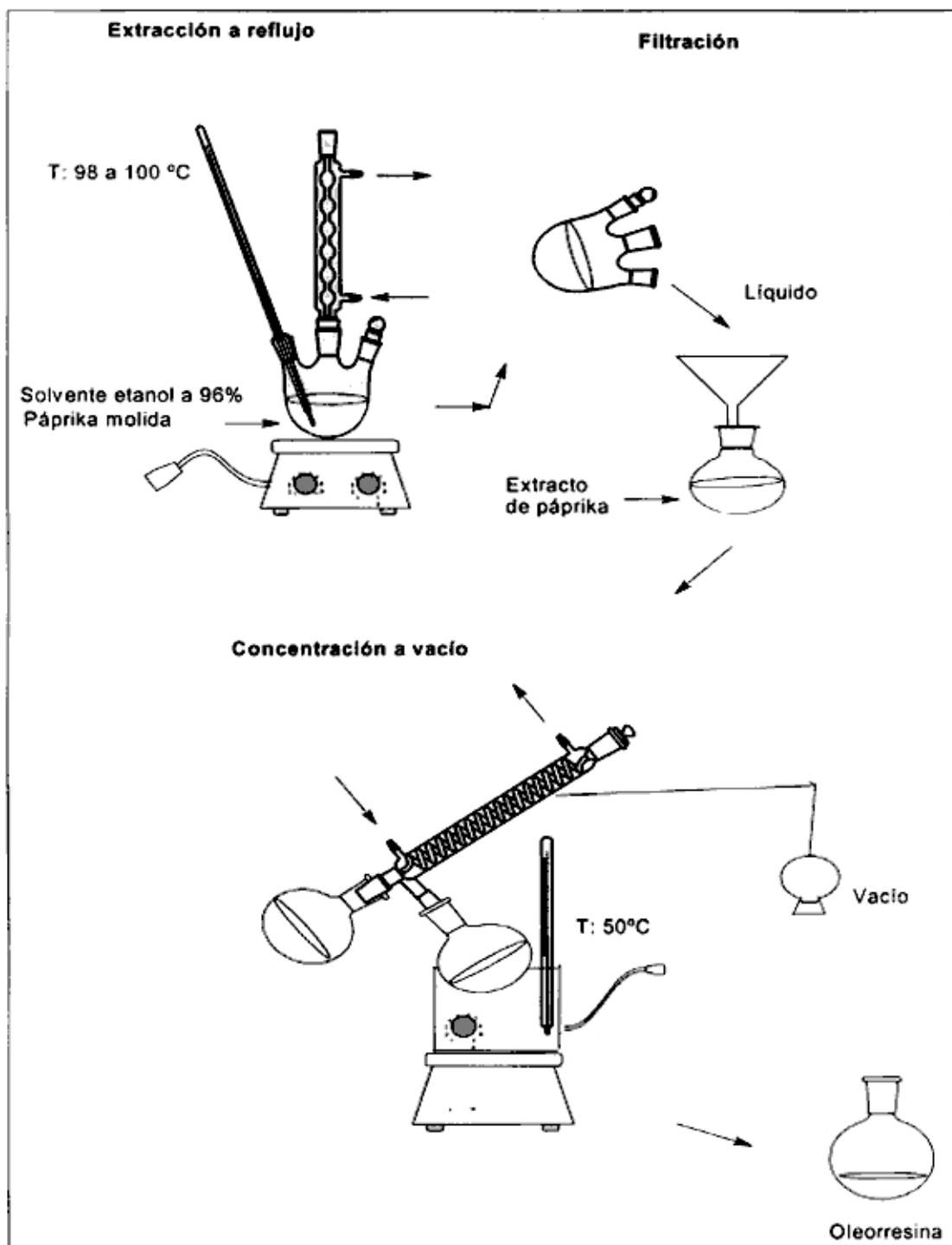


Figura 19. Diagrama de flujo de Extracción sólido-líquido para la obtención de oleoresina.

3.4 Separación de los pigmentos mediante una Hidrólisis Enzimática

Los pigmentos carotenoides se encuentran en forma natural como ésteres de ácidos grasos.

A través del proceso de hidrólisis enzimática, estos carotenoides pasan a su estado libre, obteniéndose un mejor nivel de coloración de los pigmentos.

La separación enzimática consta de dos etapas.

a) Primera etapa: hidrólisis enzimática.

Para el aislamiento de los pigmentos carotenoides de la oleoresina se emplea la hidrólisis enzimática, que consiste en tratar una muestra de 3 g de oleoresina con 15 mL de lipasa diluida de concentración 0,1 mL enzima / mL. solución, mas 35 mL de agua destilada, agitar con la ayuda de un agitador magnético a temperatura ambiente; se observa rápidamente en la solución la formación de un precipitado, entonces tiempo después se da por terminada la hidrólisis. La Figura 21 muestra la hidrólisis y la Figura 20 la reacción de la hidrólisis enzimática.

La hidrólisis se realiza con diferentes dosis de enzima y diferentes tiempos, como muestra el cuadro 15.

Cuadro 15. Dosis de enzima y tiempo de reacción.

Volumen enzima/ Woleorresina(mL/g)	Vol. enzima/ Vol.Solución(mL/mL)	Tiempo (min)
0,5/3,0	0,5 / 50	12, 24, 36, 48, 60, 72, 120
1 ,0/3,0	1,0 / 50	15, 30, 45, 60
1,5/3,0	1,5 / 50	15, 30, 45, 60, 120, 180, 240
2 ,0/3,0	2,0 / 50	15, 30, 45, 60, 120, 180, 240
3 ,0/3,0	3,0 / 50	15, 30, 45, 60, 120, 180, 240

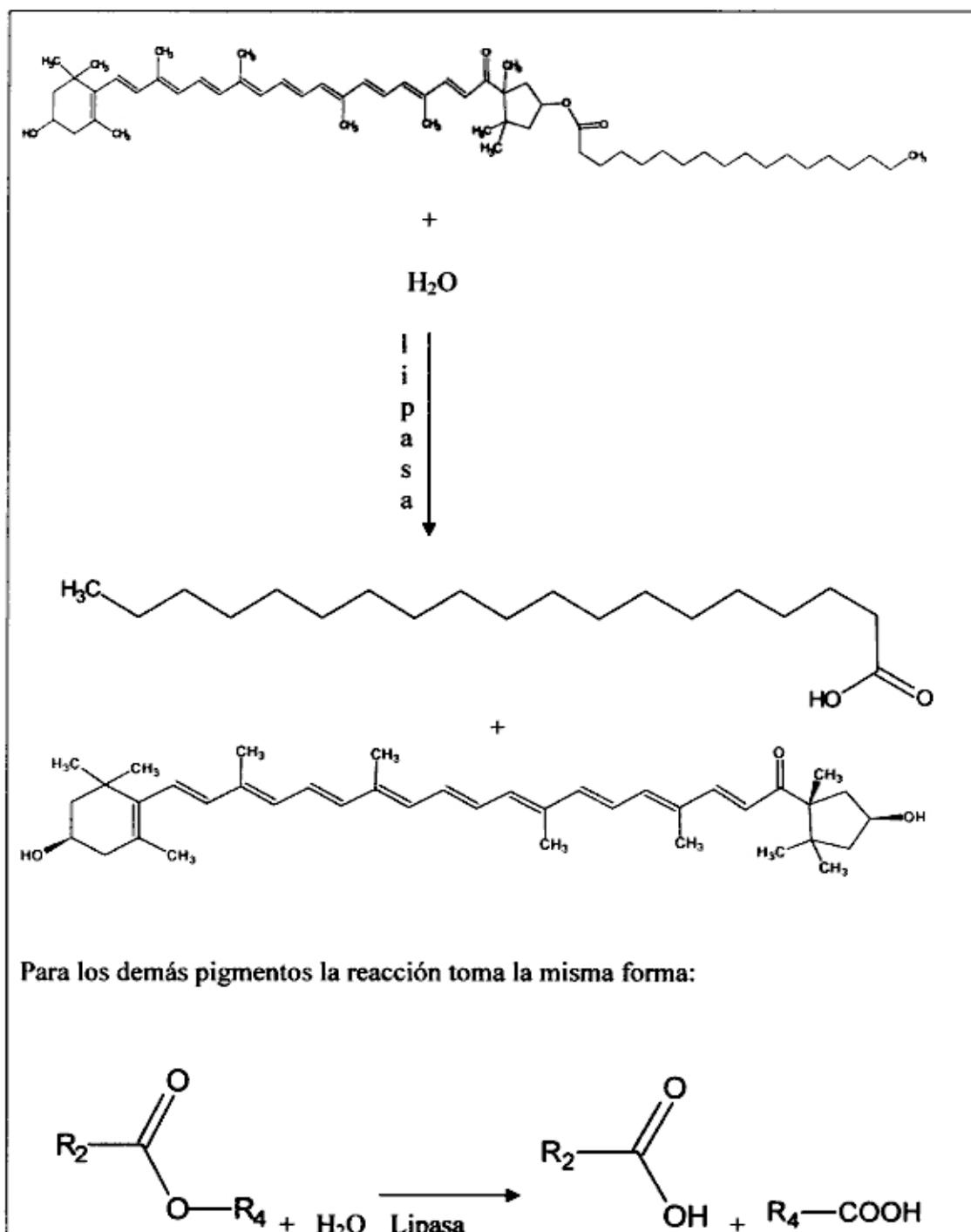


Figura 20. Reacción de hidrólisis enzimática de la capsantina esterificada con ácido esteárico.

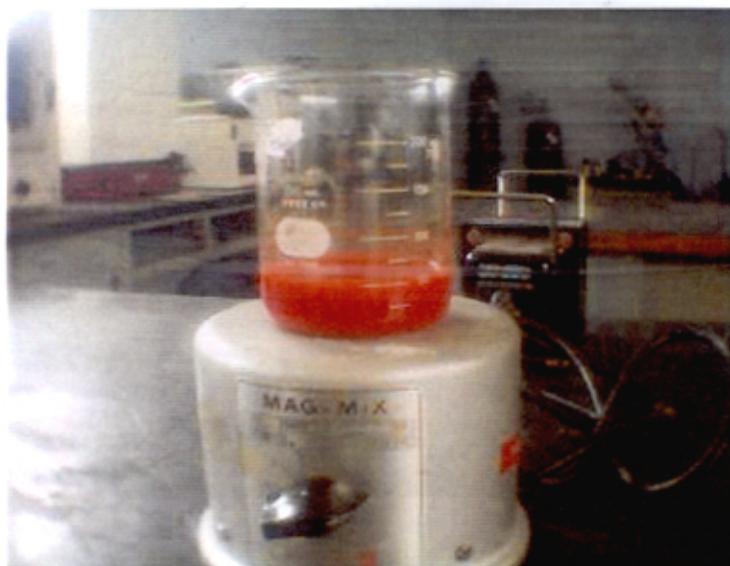


Figura 21. Hidrólisis enzimática de los pigmentos carotenoides.

b) Segunda etapa, aislamiento de los pigmentos.

Una segunda etapa, es el aislamiento de los pigmentos mediante la extracción con cloruro de metileno. Consiste en usar toda la solución hidrolizada, porque el precipitado no se puede separar fácilmente de la solución, y también porque la parte acuosa de la solución hidrolizada tiene buena coloración rojo, por lo tanto no sería recomendable desechar el líquido acuoso. Entonces a la solución hidrolizada se le extrae los pigmentos. Con 3 mL de cloruro de metileno, en una pera de separación de 1 litro, se agita suavemente y se deja reposar por 10 minutos aproximadamente hasta observar dos fases, la fase cloruro metilénica en la parte inferior de un color rojo intenso y la fase acuosa en la parte superior, como muestra la Figura 22; la extracción se realiza mínimo tres veces (verificando que la última extracción sea de un color tenue), luego juntar los tres extractos de cloruro de metileno para que pasen a una evaporación del solvente y finalmente se haya obtenido el producto final, como muestra la Figura 23.

El producto final pasa a un análisis cuantitativo para la evaluación del nivel de color de los pigmentos.

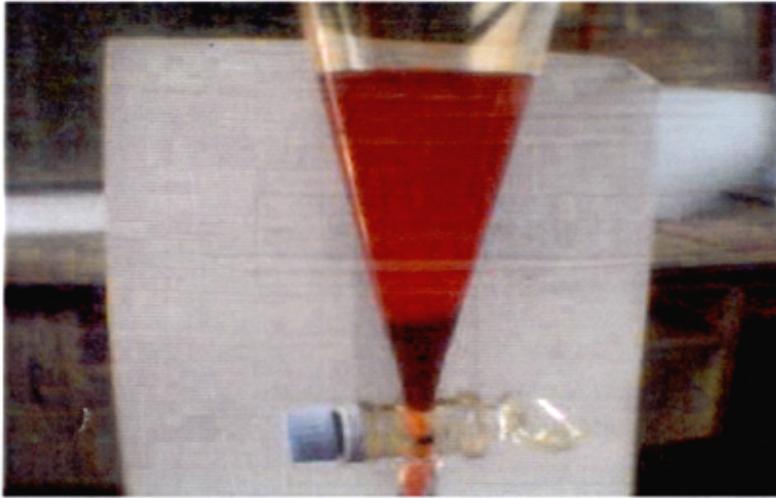


Figura 22. Extracción con cloruro de metileno para el aislamiento de los pigmentos.



Figura 23. Producto final de la hidrolisis enzimática.

La Figura 24 y Figura 25, muestran los diagramas de flujo de la separación enzimática hasta la obtención del producto final.

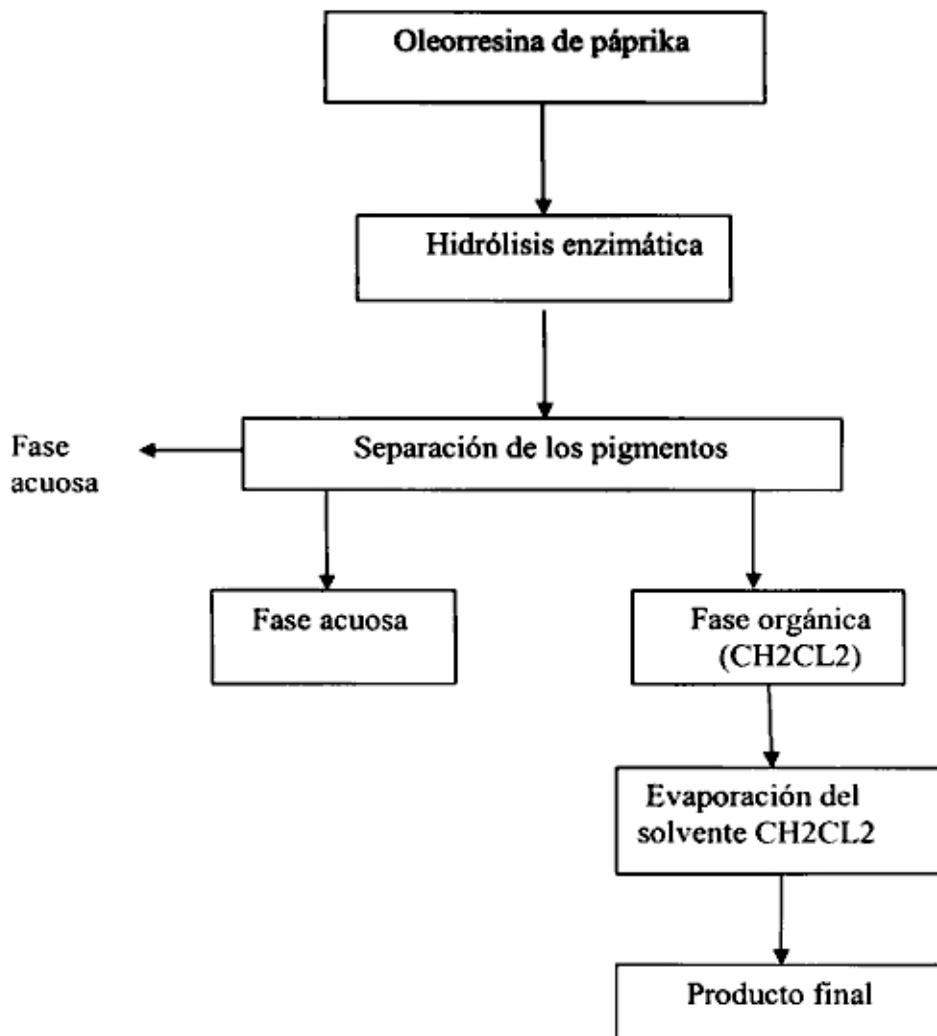


Figura 24. Diagrama de bloques del tratamiento enzimático.

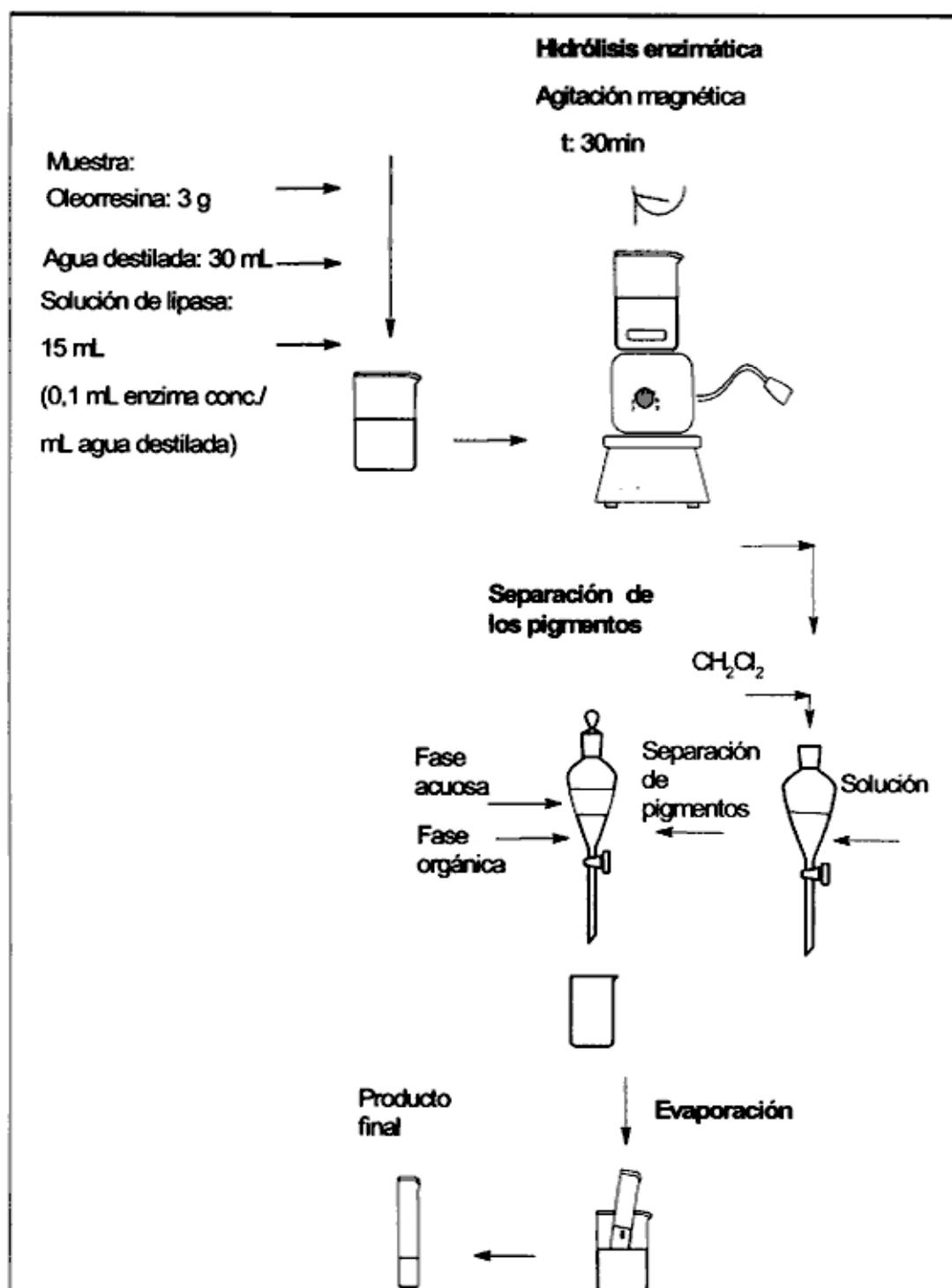


Figura 25. Diagrama de flujo del tratamiento enzimático.

3.5 Análisis cuantitativo de la separación enzimática

El análisis cuantitativo es para saber si se tiene mejoras en la concentración del pigmento, lo que quiere decir, disminución de grasa con respecto a la oleorresina y las diferentes muestras hidrolizadas. Por lo tanto, realizar un análisis cuantitativo a una muestra del producto final de la etapa aislamiento de los pigmentos, dará como resultado que una muestra hidrolizada debe tener mayor contenido de capsantina que una sin hidrolizar (oleorresina).

Para realizar el análisis cuantitativo hacer el siguiente procedimiento.

Procedimiento del análisis cuantitativo. Realizar una dilución a una muestra de 10 mg del producto final con cloruro de metileno en una fiola de 10 mL, esta dilución es muy concentrada para hacer lecturas de absorbancia, por lo tanto, realizar una segunda dilución tomando 1 ml de la primera solución y diluir con cloruro de metileno en una fiola de 10 ml, entonces, hacer lecturas de absorbancia en el equipo Ultravioleta, en un rango de longitud de onda de 400 a 520 nm; usar celdas de cuarzo y como blanco cloruro de metileno.

En la Figura 26, se observa el espectro del pigmento con hidrólisis y sin hidrólisis (solo oleorresina), con picos máximos de absorbancia 0,345 y 0,043 respectivamente, y, a una longitud onda de 459 nm. en los dos casos.

Con este análisis se puede decir que la concentración de la capsantina es mayor después de una hidrólisis, por la comparación de absorbancias de 0,345 en la hidrolizada y 0,043 en la sin hidrolizar (oleorresina), dado que la concentración es directamente proporcional a la absorbancia. Por lo tanto, resulta muy conveniente realizar una hidrólisis.

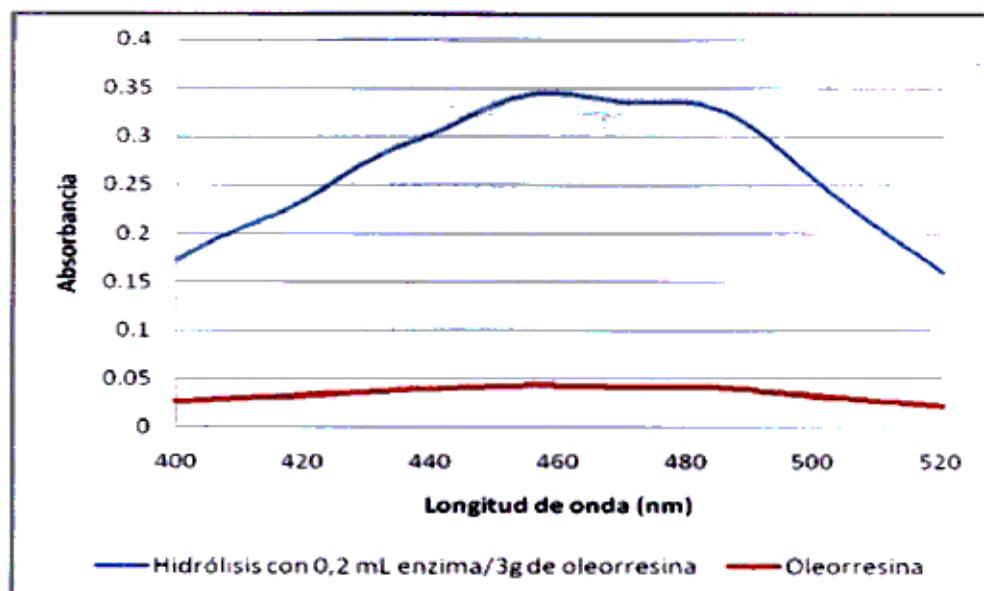


Figura 26. Comportamiento de la capsantina en una muestra hidrolizada y sin hidrolizar (oleorresina).

3.6 Separación de los pigmentos mediante la saponificación con KOH_{ac}

Otro método de separación de pigmentos carotenoides es la saponificación con KOH en medio acuoso (hidrólisis básica).

Los pigmentos carotenoides se encuentran en forma natural como ésteres de ácidos grasos. A través del proceso de saponificación estos carotenoides pasan a su estado libre, obteniéndose un mejor nivel de coloración de los pigmentos.

Este procedimiento de separación implica tres etapas: La saponificación propiamente dicha, la precipitación de carboxilatos y la extracción del pigmento con cloruro de metileno.

a) Primera etapa, saponificación con KOH acuoso IN.

En esta etapa se realiza la separación de los pigmentos, mediante la reacción de saponificación, en esta reacción la grasa del pigmento pasa a ser un jabón líquido por la presencia del KOH_{ac} y así el pigmento está en su forma libre, pero ambos se encuentran solubles, por tal razón, se tiene que hacer precipitar el jabón líquido, y esto se tratará en la segunda etapa.

En esta primera etapa realizar el siguiente procedimiento.

Procedimiento de saponificación.

Pesar 5 gramos de oleoresina y poner en un balón de 300 mililitros, añadir 100 mililitros de la solución KOH_{ac} 1N (Masa oleoresina/Volumen $\text{KOH}_{\text{ac}}=1/20$) y tapar. Saponificar a temperatura de 60°C y agitar constantemente durante 6 horas aproximadamente, se observa que la presencia de oleoresina va disminuyendo con el tiempo de saponificación. Durante la saponificación, sacar a cada hora una muestra de solución saponificada. Estas muestras son llevadas al equipo Ultravioleta, para el respectivo análisis cuantitativo.

La Figura 27, muestra la reacción de saponificación de los pigmentos carotenoides.

b) Segunda etapa, precipitación de carboxilatos presentes.

Los ácidos carboxílicos libres se hacen precipitar con solución de CaCl_2 al 20 %.

Procedimiento de precipitación de carboxilatos.

Utilizar CaCl_2 al 20 % y alcohol rectificado al 96%. Agregar a la solución saponificada de 100 mililitros, 100 mililitros de agua y 50 mililitros de alcohol. Agregar CaCl_2 gota a gota y agitar constantemente hasta formación completa de precipitado. Este precipitado es color rojo y el líquido flotante es de color amarillo, lo cual indica la presencia de otros carotenoides como xantofilas y β carotenos.

Centrifugar durante 20 minutos para una mejor separación entre sólido y líquido. Desechar el líquido y secar la parte sólida hasta el día siguiente a temperatura ambiente.

Figura 25. Diagrama de flujo del tratamiento enzimático.

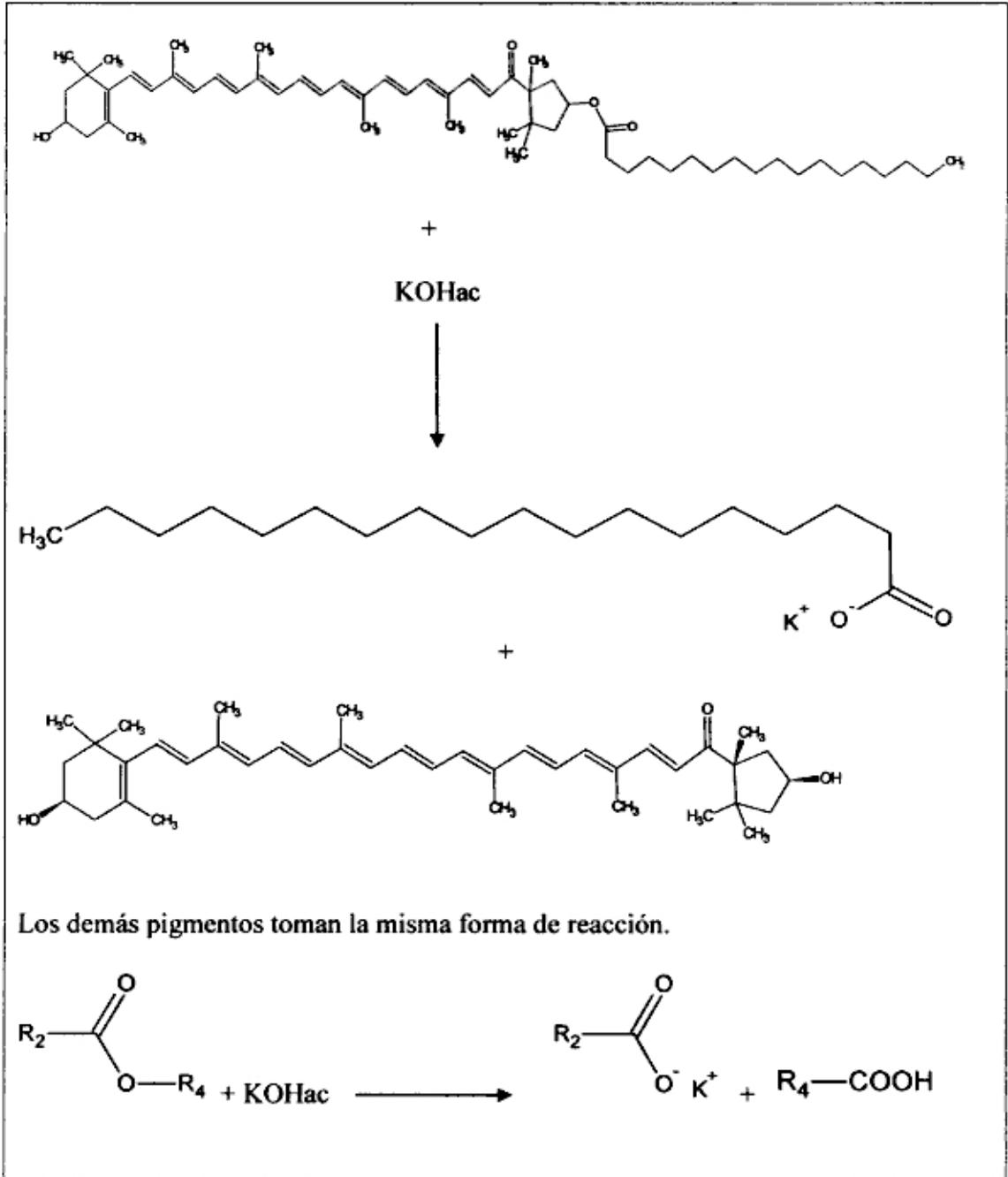


Figura 27. Reacción de saponificación de la capsantina esterificada con ácido Esteárico.

c) Tercera etapa, extracción del pigmento.

En esta etapa, se aísla los pigmentos del precipitado mediante la extracción con cloruro de metileno.

En esta tercera etapa realizar el siguiente procedimiento de extracción del pigmento:

Una vez seco el precipitado, extraer el pigmento del precipitado en una probeta con 20 mililitros de cloruro de metileno, agitando suavemente hasta observar dos fases, la fase cloruro metilénica en la parte superior, donde los pigmentos están solubles, y la otra en la parte inferior, donde se encuentran los sólidos; realizar tres veces la extracción, para obtener la mayor cantidad posible de pigmentos. Luego juntar los extractos y centrifugar para poder eliminar cualquier residuo sólido. Decantar y juntar los extractos en un balón de 200 mililitros. Concentrar con el Rotavaporador a vacío. De ésta manera obtenemos el producto final.

3.7 Análisis cuantitativo de la separación por saponificación con KOH_{ac}

El análisis será específicamente sobre la capsantina ya que es el pigmento de mayor cantidad.

Procedimiento de evaluación. Diluir una muestra del producto final, proveniente de la saponificación con 30 mL de KOH_{ac} 1N, con cloruro de metileno, en una fiola de 10 mL. Realizar una segunda dilución y hacer lecturas de absorbancia con el equipo Ultravioleta, en un rango de longitud de onda de 400 a 520 nm; usar celdas de cuarzo y como blanco cloruro de metileno.

En la Figura 28, se observa el pico máximo, de absorbancia 0,613 y longitud de onda 450 nm. Con estos datos y por la forma de la curva, se puede corroborar que el nivel de color es semejante a los tratados con hidrólisis

enzimática. Ambos casos, tanto la hidrólisis enzimática como la saponificación con KOH_{ac} , mejoran el nivel de color comparado con la de oleoresina de absorbancia 0.043.

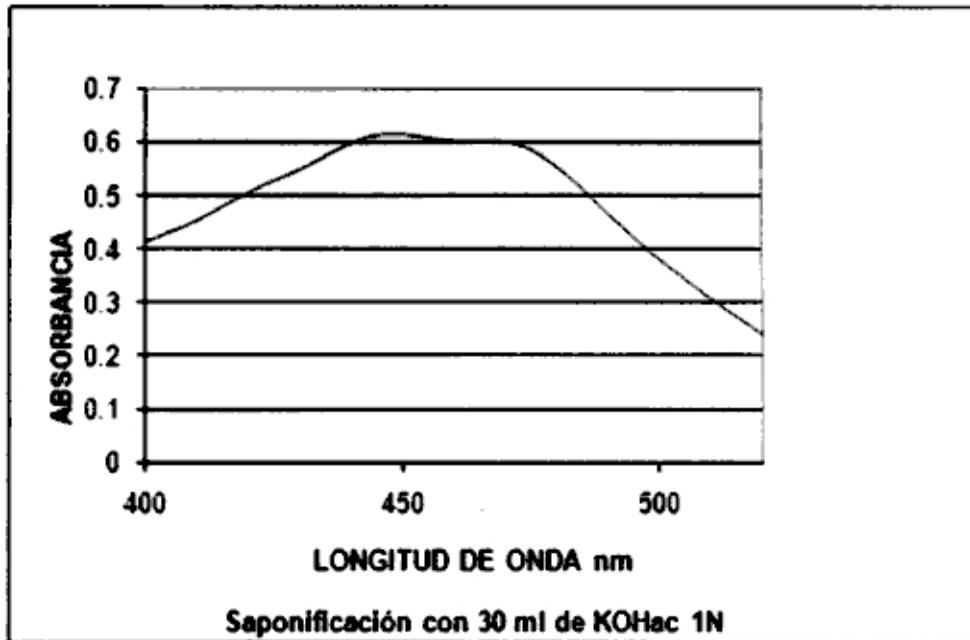


Figura 28. Comportamiento de la capsantina después de la saponificación.

CAPITULO IV: RESULTADOS DE LA EVALUACION DE LOS PIGMENTOS CAROTENOIDES

4.1 Método de análisis de los pigmentos

La metodología de análisis de los pigmentos carotenoides será mediante un análisis cuantitativo, que se presenta a continuación.

Procedimiento. Diluir una muestra de 10 mg del producto final, de la separación por hidrólisis enzimática o la separación por saponificación, con cloruro de metileno en una fiola de 10 mL. Como esta dilución es muy concentrada para hacer lecturas de absorbancia, entonces realizar una segunda dilución. Finalmente hacer lecturas de absorbancia con el equipo Ultravioleta, en un rango de longitud de onda de 400 a 520 nm; usar celdas de cuarzo y como blanco cloruro de metileno.

4.2 Evaluación de los pigmentos por el método de Separación Enzimática

En esta evaluación, los pigmentos esterificados de la oleoresina reaccionan con el agua gracias a una alícuota de lipasa diluida de concentración 0,1mL enzima / mL solución, formándose un precipitado rojo. Los diferentes niveles de coloración de la capsantina se evalúan mediante la medida de absorbancia leída a un rango de 400 a 520 nm.

En la hidrólisis enzimática cada muestra problema se trata con diferentes dosis de lipasa diluida de concentración 0,1mL enzima / mL solución y, a diferentes tiempos.

4.2.1 Análisis del Tiempo de reacción de la Hidrólisis

Para la evaluación de separación enzimática se prepara soluciones hidrolizadas con 3 g de oleoresina, una alícuota de lipasa diluida 0,1mL enzima / mL. solución de 15 mL, más 35 mL de agua destilada, para tiempos de 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240 minutos. Esta evaluación se hará también para diferentes dosis de enzima.

Terminada la hidrólisis y aislamiento de pigmentos, realizar el análisis cuantitativo explicado en 4.1.

El Cuadro 16 muestra los resultados de la hidrólisis enzimática. En la Figura 29 se observa que para un tiempo de 30 minutos se logra obtener una mayor separación del pigmento capsantina, pero la menor separación enzimática se logra en 4 horas. En la Figura 30 se observa que la mayor separación se logra en el tiempo de 15 minutos y la menor separación de pigmentos en 3 horas. En la Figura 31 se observa que la mayor separación se logra en 30 minutos y la menor separación de pigmentos en 4 horas. El comportamiento de separación del pigmento en función del tiempo en los tres casos son semejantes, así que se resume que en rangos de tiempos menores de 15 a 60 minutos se tiene una mayor separación de pigmentos y luego de 60 minutos tiene una tendencia a disminuir la concentración del pigmento capsantina; por lo tanto no es recomendable trabajar tiempos largos porque a mayor tiempo los pigmentos comienzan a degradarse ya que estos pigmentos carotenoides poliénicos son muy sensibles a la luz y al calor, etc. También se puede observar que la separación de pigmentos en el rango de 30 a 60 minutos es aproximadamente constante, entonces en ese rango de tiempo se está llegando a la reacción final de la hidrólisis, esto quiere decir que la enzima lipasa actúa muy rápido para ayudar a producir la hidrólisis. Un tiempo apropiado para cortar la hidrólisis será entonces un tiempo promedio del rango 15 a 60 minutos, por que luego de este tiempo se comienza a degradar.

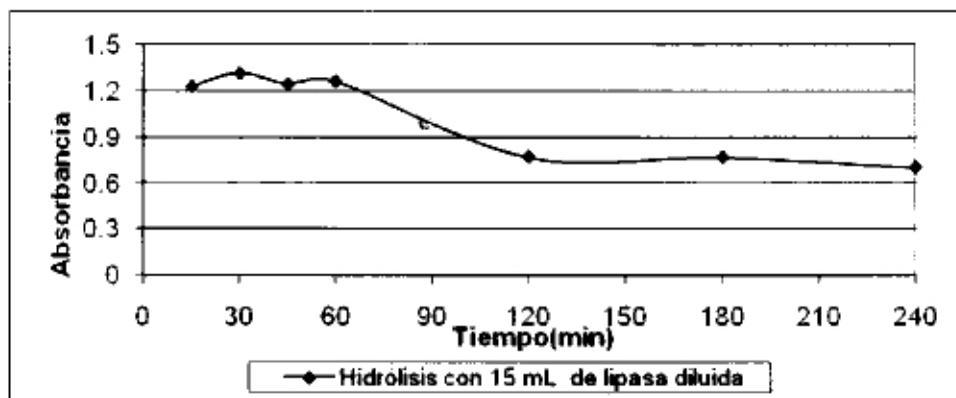


Figura 29. Evaluación de la hidrólisis enzimática para una dosis de 15 mL de lipasa diluida, 0,1mL enzima / mL solución, a diferentes tiempos

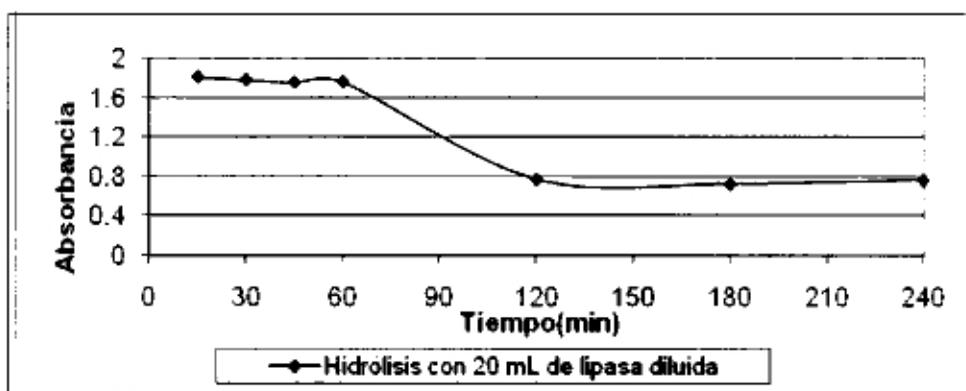


Figura 30. Evaluación de la hidrólisis enzimática para una dosis de 20 mL de lipasa diluida, 0,1mL enzima / mL solución, a diferentes tiempos.

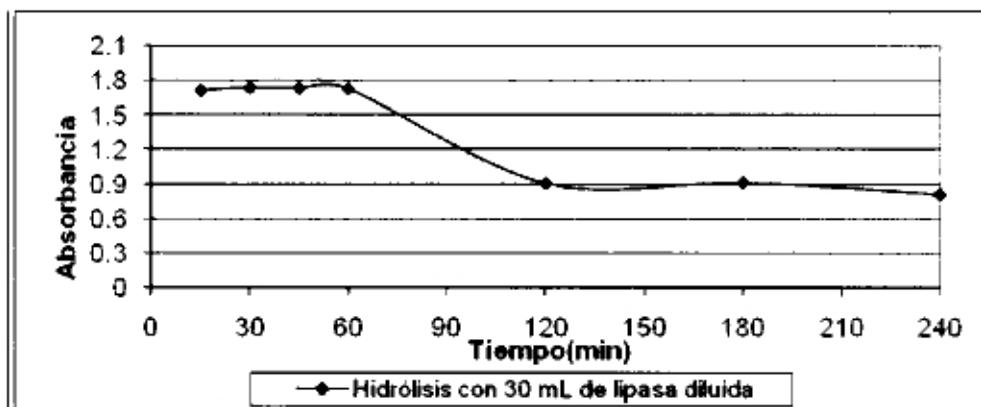


Figura 31. Evaluación de la hidrólisis enzimática para una dosis de 30 mL de lipasa diluida, 0,1mL enzima / mL solución, a diferentes tiempos.

Cuadro 16. Evaluación de la concentración de enzima en función del tiempo.

Enzima Dosis (mL enzima/ 3g oleorresina)	Tiempo (min)	Absorbancia de Capsantina
1,5	15	1,226
1,5	30	1,314
1,5	45	1,242
1,5	60	1,26
1,5	120	0,769
1,5	180	0,769
1,5	240	0,704
2	15	1,803
2	30	1,775
2	45	1,747
2	60	1,755
2	120	0,772
2	180	0,726
2	240	0,767
3	15	1,719
3	30	1,742
3	45	1,739
3	60	1,735
3	120	0,909
3	180	0,917
3	240	0,814

4.2.2 Efecto de la concentración de enzima

Para la evaluación de este efecto se realiza la hidrólisis. Se prepara una dilución de lipasa de 0,1 mL enzima / mL solución. Se evalúan para dosis de 5, 10, 15, 20, 30 mL de lipasa diluida a un mismo rango de tiempo, y temperatura ambiente.

Usar un tiempo máximo de 1 hora, debido que a partir de ese tiempo comienza la degradación.

El efecto de la concentración de 5 mL de lipasa diluida 0,1mL enzima / mL solución

Para la evaluación de la separación por hidrolisis enzimática, preparar una solución hidrolizada con una muestra de 3 gramos de oleoresina y una dosis de 5 mL de lipasa diluida de 0,1mL enzima / mL solución (0,5 mL enzima/3 g oleoresina) más 45 mL de agua destilada, para tiempos de 12, 24, 36, 48, 60, 72, 120 minutos.

El Cuadro 17 muestra la dosificación de la enzima.

Cuadro 17. Dosificación de enzima-lipasa.

Volumen lipasa/Peso oleoresina (mL/g)	Volumen lipasa/ Volumen Solución (mL/mL)	Tiempo (minutos)
0,5/3	0,5 / 50	12, 24, 36, 48, 60, 72, 120

En este ensayo se observa que para la dosis de 5 mL no hay reacción en todo ese rango de tiempo de 12 a 120 minutos ya que hay presencia de grasa en todo ese tiempo y no se observa cambio alguno por lo que se necesita mayor concentración de lipasa para ayudar a activar la reacción. Con esta evaluación se puede decir que para activar la reacción, la mínima concentración de enzima estaría por encima de 0,5 mL.

El efecto de la concentración de 10, 15, 20, 30 mL de lipasa diluida 0,1mL enzima / mL solución

Según el análisis cualitativo se observa que con 10 mL de lipasa diluida ya ocurre reacción por la presencia de un precipitado.

Para la evaluación de separación por hidrólisis enzimática, se prepara soluciones hidrolizadas, con muestras de 3 gramos de oleorresina, agua destilada, y alícuotas de lipasa diluida de 0,1mL enzima / mL solución, para dosis de 10, 15, 20, 30 mL, con tiempos de 15, 30, 45, 60, minutos.

El Cuadro 18, muestra la dosificación de la enzima-lipasa.

Cuadro 18. Dosificación de enzima-lipasa.

Volumen lipasa/ Peso oleorresina (mL/g)	Volumen lipasa/ Volumen Solución (mL/mL)	Tiempo (minutos)
1 / 3	1 / 50	15, 30, 45, 60
1,5 / 3	1,5 / 50	15, 30, 45, 60
2 / 3	2 / 50	15, 30, 45, 60
3 / 3	3 / 50	15, 30, 45, 60

Terminada la hidrólisis y el aislamiento de los pigmentos de cada dosificación, realizar un análisis cuantitativo.

Procedimiento de análisis cuantitativo. Diluir una muestra de 10 mg del producto final con cloruro de metileno en una fiola de 10 mL. Como esta dilución es muy concentrada, realizar una segunda dilución, luego hacer lecturas de absorbancia con el equipo Ultravioleta; usar celdas de cuarzo y como blanco cloruro de metileno. Fijar una longitud de onda de 460 nm para el análisis.

Los resultados se resumen en Cuadro19 y el comportamiento del pigmento (capsantina) se puede observar en la Figura 32. En la misma se observa que a medida que se incrementa la dosis, se obtiene mayor separación del pigmento. Esto quiere decir que en la

hidrólisis anterior sigue habiendo reacción, y que todavía no ha terminado la reacción, como lo indica la absorbancia de la capsantina en el gráfico. Como se sabe la absorbancia es un indicador de la concentración. Entonces a mayor concentración de capsantina mayor separación de los pigmentos.

En las evaluaciones de las cuatro dosis para el rango de tiempo de 15 a 30 minutos, es donde ocurre mayor separación de los pigmentos. Por lo tanto, se puede decir que la separación es rápida y que el catalizador enzima lipasa es efectiva. Para la elección de una concentración apropiada de enzima, usar el de 20 ó 30 mL es indiferente puesto que sus valores son muy aproximados, con esta observación se puede decir que la dosis está llegando a su punto máximo. Quiere decir que ya no sería necesario aumentar la concentración de enzima por que provocaría una sobre saturación de la enzima y sería un gasto innecesario.

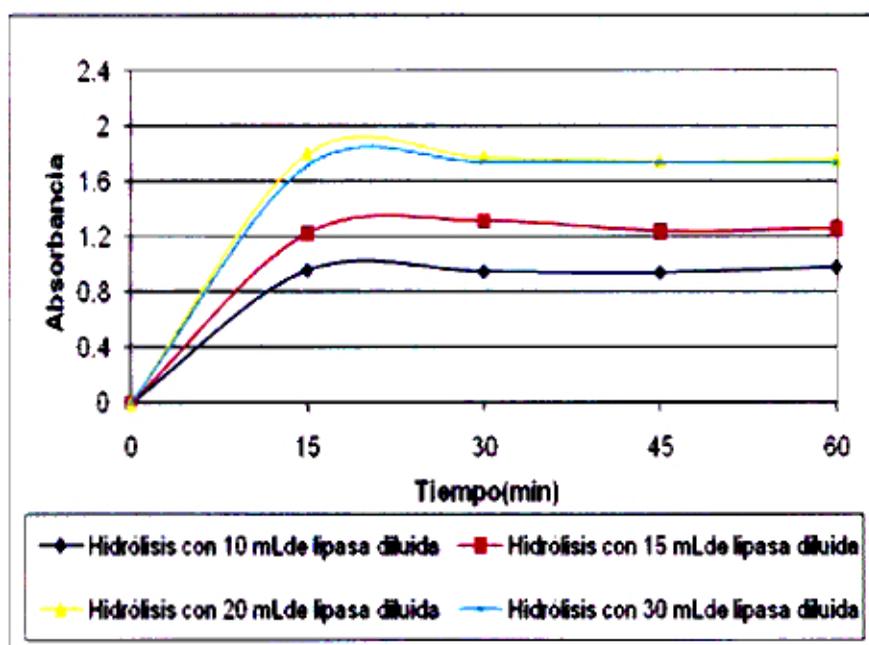


Figura 32. Evaluación de la hidrólisis enzimática a diferentes concentraciones de enzima.

Cuadro 19. Evaluación de la hidrólisis enzimática con diferentes dosis de enzima-lipasa.

Dosis de enzima (mL enzima/3g oleoresina)	Tiempo (minutos)	Absorbancia de Capsantina
0,1	15	0,958
0,1	30	0,948
0,1	45	0,942
0,1	60	0,981
1,5	15	1,226
1,5	30	1,314
1,5	45	1,242
1,5	60	1,26
2	15	1,803
2	30	1,775
2	45	1,747
2	60	1,755
3	15	1,719
3	30	1,742
3	45	1,739
3	60	1,735

4.3 Evaluación de los pigmentos por el método de Separación por Saponificación con KOH_{ac}

En esta evaluación los pigmentos de la páprika que se encuentran esterificados reaccionan con el KOH_{ac} de concentración 1N, pasando éstos a su estado libre, formándose de esta manera el precipitado rojo.

Se realizan ensayos utilizando diferentes dosis de solución de KOH_{ac} 1N a 60°C y a diferentes tiempos de saponificado.

4.3.1 Efecto de la concentración de KOH_{ac}

Para la separación por saponificación se trata muestras de 5 gramos de oleoresina con dosis de 20 y 30 ml de KOH_{ac} 1N a 60°C y tiempos de 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas.

Terminada la separación por saponificación, se realiza el análisis cuantitativo.

Procedimiento del análisis cuantitativo. Diluir una muestra de 10 mg del producto final, con cloruro de metileno en una fiola de 10 ml. Como esta dilución es muy concentrada, realizar una segunda dilución, luego hacer lecturas de absorbancia con el equipo Ultravioleta, en un rango de longitud de onda de 400 a 520 nm; usar celdas de cuarzo y como blanco cloruro de metileno.

Se miden las absorbancias a una longitud de onda de 455 nm.

El Cuadro 20 muestra los resultados de separación por saponificación.

El comportamiento se puede observar en la Figura 33, donde a mayor concentración de KOH_{ac} se obtiene mayor separación de pigmento, puesto que la concentración del pigmento aumenta. De la curva obtenida con mayor concentración, 30 ml de KOH_{ac} , también se observa que a mayor tiempo de saponificación la concentración es mayor hasta 5 horas, a partir de ese tiempo empieza la degradación. Por lo tanto, la saponificación tiene que terminar antes de las 5

horas, porque lo que se quiere es mejorar el nivel de color y no disminuirla.

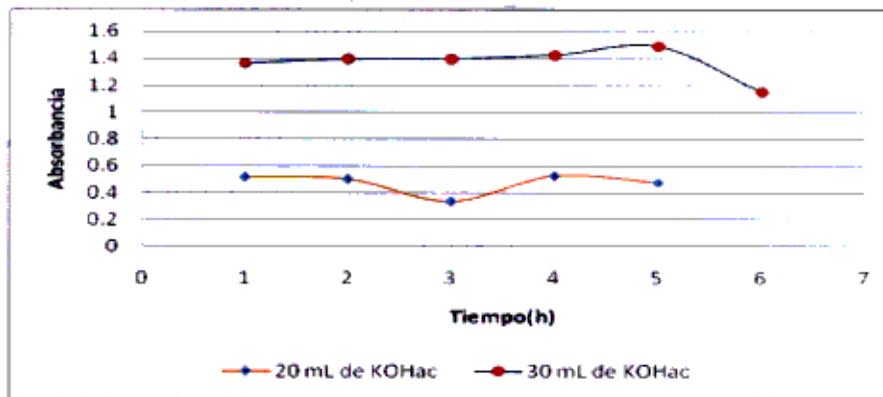


Figura 33. Evaluación de la separación de pigmentos mediante la saponificación con diferentes dosis de KOHac en función del tiempo.

Cuadro 20. Evaluación de la separación de pigmentos con diferentes concentraciones de KOH_{ac} 1N.

KOHac 1 N (mililitros)	Tiempo (horas)	Absorbancia de capsantina
20	1	0,516
20	2	0,501
20	3	0,335
20	4	0,526
20	5	0,475
30	1	1,364
30	2	1,396
30	3	1,398
30	4	1,427
30	5	1,492
30	6	1,153

4.4 Comparación de la separación enzimática con la separación por saponificación con KOH_{ac} 1N

Otro método de separación de pigmentos es la saponificación con KOH_{ac} , pero este método no es conveniente ya que cuando se realiza la saponificación de la oleoresina toma mucho tiempo en observarse reacción alguna como la formación de precipitado.

Para hacer la comparación, se realizará una gráfica, donde, para ambos se tomará la mejor curva, la que muestre mayor concentración de pigmento (capasantina).

En la Figura 34 se muestra la comparación de la separación por hidrólisis enzimática con la separación por saponificación con KOH_{ac} 1N. En esta figura se observa que con la hidrólisis enzimática, se obtiene mejor nivel de color en menor tiempo, por debajo de 1 hora. En cambio en la saponificación con KOH_{ac} , se necesita mayor tiempo, aproximadamente 5 horas, para que el nivel de color sea mayor. Entonces con este análisis, es más recomendable realizar una separación con hidrólisis enzimática, y también porque esta alternativa es biodegradable.

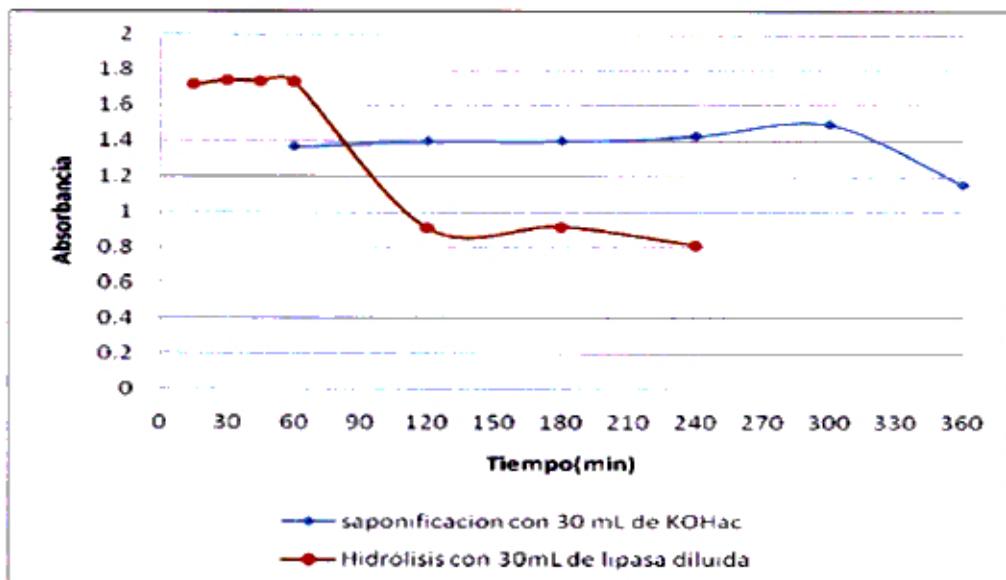


Figura 34. Comparación entre la separación enzimática con la separación por saponificación con KOH_{ac} 1N.

4.5 Sugerencia Final

La tesis “Aislamiento de los pigmentos carotenoides del paprika (*capsicum annuum*)”, es un estudio teórico experimental acerca del comportamiento del pigmento (oleorresina) frente a una hidrólisis enzimática, para mejorar el nivel de color, y practicidad en el almacenamiento, porque se reduce el volumen, con la etapa de procesamiento biodegradable, como la hidrólisis enzimática.

Proponemos continuar con la evaluación de la hidrólisis enzimática considerando otros pigmentos liposolubles.

Como se ha mencionado en capítulos anteriores, la hidrólisis enzimática presenta un nivel de separación de la grasa, mejor que un tratamiento inorgánico, siendo entonces una alternativa más de tecnología limpia para el tratamiento de la separación de la grasa de los pigmentos liposolubles. En si la aplicación de este tratamiento sería en la agroindustria.

El proceso por un tratamiento biodegradable, como la hidrólisis enzimática, está descrito en la figura 35; siendo esta para un procedimiento a nivel laboratorio, puede ser aplicable para una planta piloto o en su momento para una planta industrial.

La enzima lipasa, de nombre comercial Lipolase 100L, es un producto biodegradable que se encuentra comercializándose en Perú por la Química Suiza S.A y otros países como España. El costo se compensaría por la dosis necesaria de la enzima, el tiempo de reacción de la hidrólisis, que haría menor el costo energético, ya que se trabaja a temperatura ambiente y tiempos bastante cortos, por ejemplo 15, 30 minutos.

El recipiente para la hidrólisis puede ser de material acero inoxidable; para evitar la corrosión, porque se trabaja con agua. Es conveniente que esté cerrado para evitar que ingresen partículas o impurezas del medio. Por lo general la hidrólisis enzimática es práctica y de fácil procedimiento.

Agregar esta etapa en el procesamiento de separación de los pigmentos liposolubles, resulta conveniente para dar un valor agregado en la

comercialización de estos tipos de pigmentos naturales, ya que apuntan a la industria alimentaria, farmacéutica y otros. Todo dependerá de los empresarios que muestren interés en implementar esta tecnología como una alternativa para dar valor agregado.

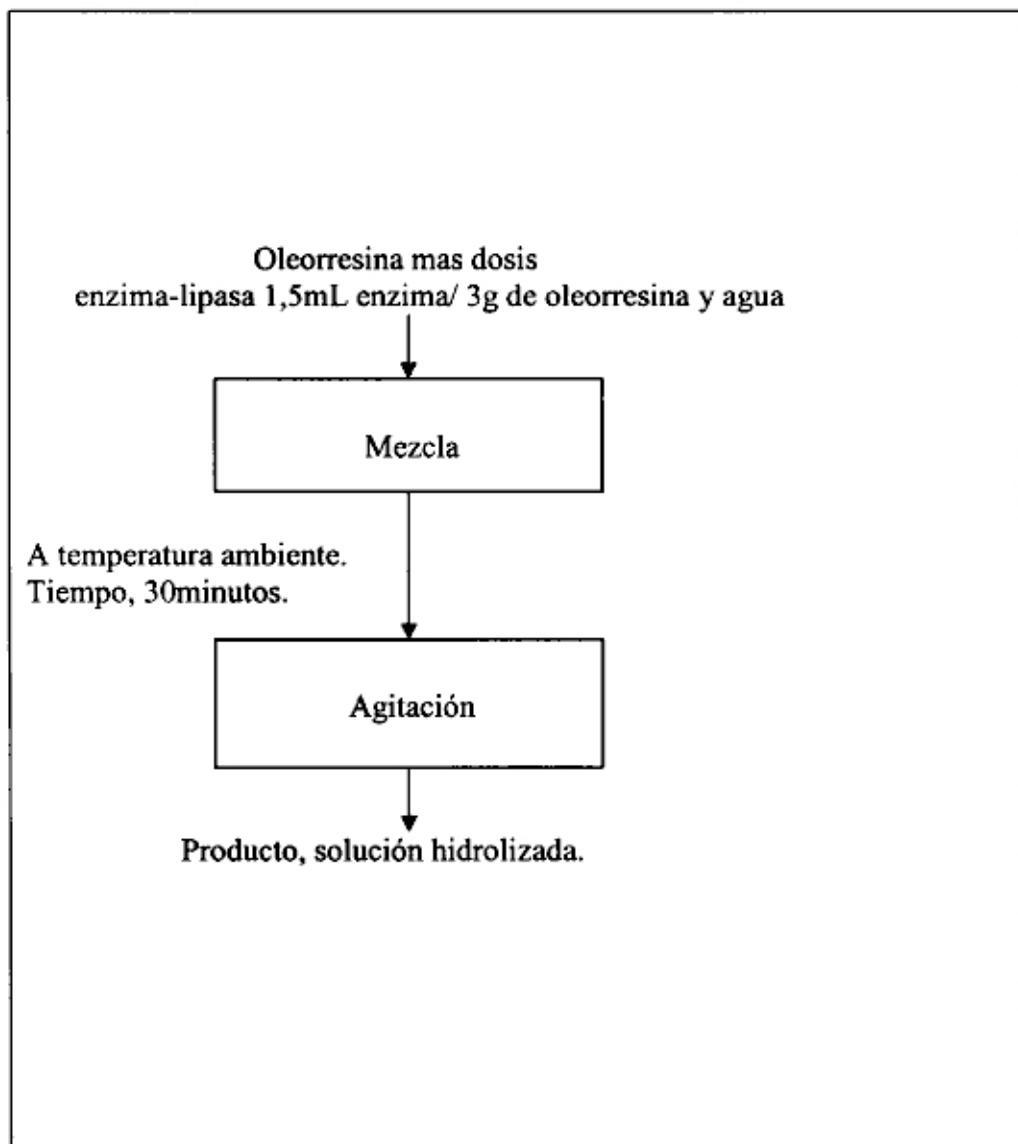


Figura 35. Hidrólisis en el tratamiento enzimático

CAPITULO V: COSTO DE PROCESAMIENTO A NIVEL PILOTO

Base: 10 kg de páprika como materia prima bruta.

*Costo de un kilo de materia prima bruta: S/.16, 00

Porcentaje aproximado de impurezas: 46,4%

Porcentaje aproximado de humedad: 12,68%

Porcentaje de materia prima sin impurezas y seca: 46,8%

Cuadro 21. Balance de masa para diez kilogramos de páprika.

OPERACIÓN	INGRESO (kg)	SALIDA (kg)
Selección de pulpa	10	5,36
Secado	5,36	4,68

Para el cálculo del costo de agua en el lavado de los materiales, se determina el número de horas trabajadas, para calcular el consumo de agua. Los cálculos se muestran en el apéndice D.

Cuadro 22. Balance de masa de etanol rectificado al 96 % en la extracción para la obtención de oleorresina.

OPERACIÓN	INGRESO (Kg)	SALIDA (Kg)
Extracción a reflujo	Primera Extracción: 23,4 kg de etanol al 96 %	18,4 kg de etanol □96 %
	Segunda Extracción: 18,4 kg de etanol □96 % + 5 kg de etanol al 96 %	18,4 kg de etanol □96 %
	Tercera Extracción: 18,4 kg de etanol □□96 % + 5 kg de etanol al 96 %	18,4 kg de etanol □96%

Cuadro 23. Requerimiento de agua y tiempos de operación para diez kilogramos de materia prima (páprika).

	OPERACIÓN	CANTIDAD
Primer Tratamiento: Obtención de oleorresina	Lavado de los materiales	
	Horas trabajadas	10 horas
	Consumo de agua potable	8 m ³
	Consumo de agua tratada	40 litros
Segundo Tratamiento: Tratamiento enzimático	Lavado de los materiales	
	Horas trabajadas	4 horas
	Consumo de agua potable	0,2 m ³
	Consumo de agua tratada	2,5 litros
	Hidrólisis	
	Consumo de agua tratada	5 litros

Para el cálculo del consumo de energía, se toma como referencia la potencia de equipos seleccionados para nivel laboratorio, así como los tiempos determinados para el proceso de 10 kg de páprika. El cálculo se muestra en apéndice D.

Cuadro 24. Consumo de energía para procesar diez kilos de páprika bruta.

	OPERACIÓN	CONSUMO (kw-h)
Primer Tratamiento: Obtención de oleorresina	Secado	28
	Extracción a reflujo	40
	Concentración y recuperación del solvente	399
Segundo Tratamiento: Tratamiento enzimático	Hidrólisis	0,11
	Evaporación	17,16

Para la estimación de los costos de procesamiento se toman los costos de agua potable, agua tratada y consumo de energía, tanto para el primer como para el segundo tratamiento. Además se estima el costo de etanol rectificado para la obtención de la oleorresina y el costo de lipasa y cloruro de metileno para el tratamiento enzimático.

El etanol rectificado al 96 % se recupera en la concentración para la obtención de oleorresina aproximadamente en un 78,6 %.

Para tratar 117 gramos de páprika molida seca (proveniente de 250 gramos de materia prima) utilizamos 0,585 litros de etanol al 96 % (peso sólido/volumen solvente = 1/5).

Por lo tanto para tratar 4,68 kilogramos de páprika molida seca (proveniente de diez kilogramos de materia prima) utilizamos aproximadamente 23,4 litros de etanol al 96 %.

Cuadro 25. Requerimiento de otros insumos para procesar diez kilogramos de páprika bruta.

	INSUMOS	CONSUMO (Litros)
Primer Tratamiento: Obtención de oleorresina	Etanol rectificado al 96 %	33,4
	Segundo Tratamiento: Tratamiento enzimático	
	Lipasa concentrada	0,66
	Cloruro de metileno	0,5

Cuadro 26. Costo total estimado para el procesamiento de 10 kg de páprika.

	DETALLE	CANTIDAD	COSTOS	SUB TOTAL (S/.)
Primer Tratamiento: Obtención de oleoresina	MATERIA PRIMA			
	Páprika	10 Kg	S/. 16,00/Kg	160,0
	INSUMOS			
	Agua potable	8 m ³	S/. 1,1/m ³	8,8
	Agua tratada	40 L	S/. 1,39/L	55,6
	Etanol rectificado al 96 %	33,4 L	S/.3,75L	125,25
	VARIABLES			
	Energía secado	28 kw-h	S/. 0,2837/Kw-h	7,9
Energía extracción a reflujo	40 kw-h	S/. 0,2837/kw-h	11,3	
Energía concentración y recuperación del solvente.	319 kw-h	S/. 0,2837/kw-h	90,5	
Segundo Tratamiento: Tratamiento enzimático	INSUMOS			
	Oleoresina	1,77 kg	S/. 45,9/kg	81,6
	Agua potable	0,2m ³	S/. 1,1/m ³	0,22
	Agua tratada	3 L	S/. 1,39/L	9,66
	Lipasa	0,66 L	S/. 124/L	81,84
	Cloruro de metileno	0,5 L	S/.16/L	8
	VARIABLES			
	Energía hidrólisis	0,08 kw-h	S/.0,2837/kw-h	0,023
Energía evaporación	3,9 kw-h	S/.0,2837/kw-h	1,1	

Costo para la obtención de oleorresina.

De los datos obtenidos del cuadro 26, se estima un costo para procesar un kilogramo de páprika que es de S/ 45,9 y de este procesamiento obtenemos oleorresina con un rendimiento de 38%.

Costo unitario para la obtención del pigmento tratado con Hidrolis enzimática.

De los datos obtenidos del cuadro 26, en el tratamiento enzimático, se estima un costo unitario.

El costo de tratar 1770 gramos de oleorresina con un tratamiento enzimático es de S/. 182,4, con un rendimiento de 18,02%.

Entonces de 1770 gramos de oleorresina se obtiene 318,9 gramos de pigmentos como producto.

Donde el costo unitario del producto es S/. 571,9/ Kg.

VI. CONCLUSIONES

- El tratamiento enzimático con lipasa es una técnica muy fácil de realizar donde se ahorra tiempo, y ayuda a proteger el medio ambiente por ser un material biodegradable.
- En el proceso de hidrólisis enzimática para la separación de pigmentos carotenoides de la páprika (*Capsicum annuum*), el rango de tiempo de separación de pigmentos es de 15 a 60 minutos, porque luego de ese tiempo comienza la degradación. Es muy importante saber dónde empieza la degradación, por que con esto se sabra cuando terminar la hidrólisis.
- Con respecto a la dosificación para la separación enzimática, se debe trabajar con dosis mayores a 10mL de lipasa diluida con una concentración 0,1mL enzima / mL solución, porque, a partir de dicha concentración recién comienza la reacción de separación de pigmentos, y esta estara llegando a un límite máximo de separación para dosis de 20 ml de lipasa diluida de concentración 0,1mL enzima / mL solución, donde, ya no separa mas pigmentos y, si se sigue agregando mas dosis de enzima se estara creando una sobresaturación de enzima. Es importante saber cuando se llega al límite de separación para evitar la sobresaturación y gastos innecesarios de enzima, tiempo, mano de obra, y otros.
- El rendimiento de la separación enzimática es de aproximadamente 81,97%. Con una base de 3g de oleorresina.
Con el método de separación por saponificación con KOH_{ac} la dosis recomendada de KOH_{ac} 1N, es 30 ml y la separación de los pigmentos con respecto al tiempo es de aproximadamente 5 horas. Posteriormente sigue la degradación.

- Comparando la hidrólisis enzimática y la saponificación con KOH_{ac} 1N, se llega a la conclusión de que el tiempo de saponificación es más largo, por ejemplo, 5 horas en el saponificado y 15 minutos en la hidrólisis enzimática.
- El saponificado con KOH_{ac} , tiene la desventaja de utilizar el KOH_{ac} , donde este producto inorgánico es tóxico mientras que el tratamiento con hidrólisis enzimático, usa la enzima lipasa que es biodegradable. Es por eso que esta tesis se inclinó en la hidrólisis enzimática.
- En la hidrólisis enzimática, se estaría necesitando una dosis de enzima lipasa como mínimo de aproximadamente 330 litros para una tonelada de oleorresina. Este cálculo es hecho a escala, de la hidrólisis de 1mL enzima/ 3g oleorresina. Este valor nos da una idea del consumo que se necesitaría para realizar la hidrólisis enzimática.
- De los costos de procesamiento se obtiene un costo unitario aproximado del producto tratado con hidrólisis enzimática, de S/. 571,9/ Kg.

VII: REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Andrew. Jean. (1985). Peppers: The Domesticated capsicum. University of Texas. Dallas- United States.
2. Basurto Rodriguez Lorenzo. (2000-2003). Proyecto: producción de oleorresina de páprika. Alnicolsa del Perú S.A.C.
3. Cardona Eliana. M; Rios Luis. A; Restrepo Gloria.M.(2006). Revista de la Facultad Química Farmaceutica. Volumen 13 N2.Universidad de Antioquia Medellin- Colombia.
4. Casanova Nuñez David Pavel. (2000). Ensayo de tres densidades de siembra en dos cultivares de pimiento páprika (*capsicum annuum L.*) .Tesis de Grado. Universidad Agraria. Perú.
5. Hart.F, Fisher.H. (1971). Análisis moderno de los alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza España.
6. L.G.Wade, Jr. (1993). Química Orgánica. Segunda Edición. Prentice- Hall. Hispanoamericana, S.A. Mexico.
7. Lock Sing de Ugaz Olga. (1997). Colorantes Naturales. Primera Edición.
8. Nuez, F; Gil, R y Acosta, J. (1996). El cultivo de pimientos chile y ajíes. Ediciones Mundi Prensa. Madrid- España.
9. Robert.H. Perry; Don. W. Green. Manual del Ingeniero Químico; Volumen III. Séptima Edición.
- 10.Yamamoto Parasi Gisela Patricia. (1995). Obtención de oleorresina de paprika (*Capsicum Annuum*) utilizando como solventes alcohol etilico y hexano. Tesis de Grado. Universidad Agraria. Perú.
- 11.www.monografias.com/trabajo5enzimo.shtmlLaEnzimologa- Monografía.com.
- 12.www.scielo.org.ve/pdf/alan/v57n2/art02.pdf. Pigmentos carotenoides.
- 13.www.bolivar.udo.edu.ve/biologia/enzima.htm. Enzimas.