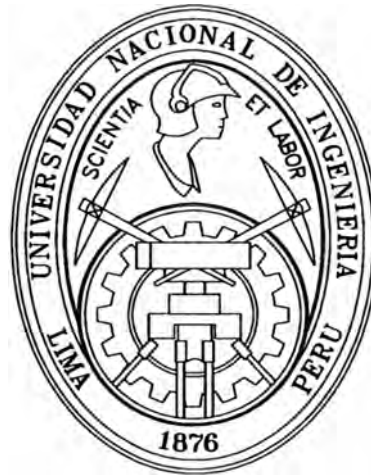


UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y TEXTIL



**“EXTRACCIÓN DE LA ENZIMA PEROXIDASA A
PARTIR DE LA ALCACHOFA (*Cynara Scolymus*)”**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO QUIMICO

PRESENTADO POR:

**MELISSA ELIZABETH PEREZ QUIROZ
ANA EDITH VASQUEZ GONZALES**

**LIMA – PERU
2005**

AGRADECIMIENTO

Al Ing. Félix Cárdenas Gago, en forma muy especial; por su apoyo incondicional en la realización del presente trabajo y sus palabras de aliento brindadas en todo momento.

Asimismo, por darnos la oportunidad de llevar a cabo el desarrollo experimental en el Laboratorio INGENIERÍA MEDICA E.I.R.L.

Al Ing. Harold Paján Lan, por su disposición y apoyo brindado como asesor durante el desarrollo de la presente tesis.

M.E.P.Q.

A.E.V.G.

DEDICATORIA

A Dios y a mis padres, Maria y Miguel,
por sus sabias palabras y apoyo brindado.

A mis hermanos, por sus palabras e
interés mostrado en el término del presente
trabajo.

A mis abuelitos y familiares, por su
paciencia y palabras de aliento brindadas.

M.E.P.Q.

DEDICATORIA

A Dios y a mis padres, Eurípides y Flor, por su apoyo incondicional y su pendiente interés en la culminación de este trabajo de investigación.

A mis hermanas, por la las palabras de aliento para finalizar el presente trabajo.

A mi compañero, por apoyarme en todo momento dándome ánimos para seguir adelante.

A.E.V.G.

RESUMEN

El presente trabajo es una investigación orientada a la obtención de la enzima peroxidasa mediante un proceso de extracción a partir de la alcachofa (*Cynara scolymus*). Asimismo se pretende elaborar un reactivo de diagnóstico clínico, con utilidad en la determinación de glucosa frecuentemente usada en la detección de ciertas enfermedades.

Las etapas, condiciones y parámetros propuestos para llevar a cabo el proceso de extracción de la enzima se determinan a partir de ensayos realizados en el laboratorio INGENIERIA MEDICA E.I.R.L.; considerando: el tamaño de partícula, el solvente de extracción, la concentración del soluto, el tiempo de extracción, el número de etapas, etc.

El reactivo elaborado incluye en su composición, la enzima peroxidasa, así como otros reactivos y estabilizantes. La reproducibilidad de resultados de los niveles de glucosa empleando el reactivo propuesto, se evalúa realizándose pruebas en suero de pacientes normales y patógenos.

Por otro lado, el presente trabajo propone el diseño de una planta piloto para la obtención de 1.3 kg por día de enzima peroxidasa. Los equipos y sus dimensiones son seleccionados y/o diseñados a partir de los requerimientos de proceso, balances de materia y energía correspondientes.

Finalmente, esperamos que la investigación realizada sea de utilidad para estudios posteriores que utilicen la enzima extraída para otros fines, dada la diversidad de aplicaciones que posee.

EXTRACCIÓN DE LA ENZIMA PEROXIDASA A PARTIR DE LA ALCACHOFA (*Cynara Scolymus*)

INDICE

RESUMEN

INDICE DE FIGURAS

INDICE DE TABLAS

INDICE DE ECUACIONES

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MATERIA PRIMA: ALCACHOFA	
2.1. Generalidades	4
2.2. Taxonomía.....	4
2.3. Morfología.....	5
2.4. Variedades de alcachofa.....	6
2.4.1. Según su origen	6
2.4.2. Según su forma	7
2.5. Condiciones para el cultivo	10
2.6. Conservación, Transporte y Comercialización	11
2.7. Usos de la Alcachofa.....	12
III. ENZIMAS	
3.1. Generalidades	14
3.2. Clasificación	15
3.3. Extracción de las enzimas	16
3.4. Factores que afectan a la actividad enzimática.....	18
3.4.1. Temperatura.....	18
3.4.2. pH y estado iónico.....	19
3.4.3. Humedad.....	20
3.5. Modelo Cinético de reacciones enzimáticas.....	20
3.6. Conservación de las enzimas	25

6.4. Influencia de la temperatura en la velocidad de reacción	70
6.5. Constante cinética de la reacción (K_m).....	70
6.6. Velocidad máxima de reacción	75
VII. APLICACIÓN DE LA PEROXIDASA	
7.1. Formulación del reactivo para la determinación de glucosa.....	76
7.2. Estabilidad del reactivo para la determinación de glucosa	78
7.3. Linealidad del reactivo para la determinación de glucosa	82
7.4. Validación del reactivo para la determinación de glucosa	83
VIII. ESQUEMA DE PLANTA PILOTO	
8.1. Balance de materia y energía	89
8.2. Selección y/o diseño de equipos	91
8.2.1. Molino de discos	91
8.2.2. Tanque extractor	92
8.2.3. Tanques mezcladores.....	95
8.2.4. Centrífugas.....	95
8.2.5. Bombas centrífugas	97
8.3. Diagrama de flujo.....	98
8.4. Diagrama de Gantt.....	100
8.5. Costo de procesamiento	100
IX. RESULTADOS	
9.1. Características de la peroxidasa	103
9.2. Evaluación del rendimiento.....	104
X. CONCLUSIONES	105
XI. RECOMENDACIONES	107
XII. BIBLIOGRAFIA	108
XIII. ANEXOS	112

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 2.1:	Taxonomía de la alcachofa
Tabla N° 2.2:	Variedades de la alcachofa
Tabla N° 2.3:	Composición y valor nutricional de la alcachofa
Tabla N° 3.1:	Compuestos utilizados en la extracción de las enzimas
Tabla N° 4.1:	Composición de la enzima peroxidasa según el contenido de aminoácidos
Tabla N° 4.2:	Intervalos de referencia para niveles de glucosa
Tabla N° 4.3:	Técnica para la cuantificación de glucosa
Tabla N° 5.1:	Relación entre tamaño de partícula y actividad relativa
Tabla N° 5.2:	Composición de los solventes utilizados en la extracción
Tabla N° 5.3:	Ventajas y desventajas de los solventes utilizados en la extracción de enzimas
Tabla N° 5.4:	Relación entre solvente y actividad relativa
Tabla N° 5.5:	Relación entre concentración de soluto y actividad relativa
Tabla N° 5.6:	Relación entre tiempo de extracción - concentración de proteínas y actividad relativa
Tabla N° 5.7a:	Relación entre número de etapas y actividad relativa (tiempos: 4-4-3 horas)
Tabla N° 5.7b:	Relación entre número de etapas y actividad relativa (tiempos: 4-3-2 horas)
Tabla N° 5.7c:	Relación entre número de etapas y actividad relativa (tiempos: 3-2-1 horas)
Tabla N° 5.8a:	Relación entre número de etapas y actividad relativa (tiempos: 4-3 horas)
Tabla N° 5.8b:	Relación entre número de etapas y actividad relativa (tiempos: 3-2 horas)

Tabla N° 5.8c:	Relación entre número de etapas y actividad relativa (tiempos: 2-1 horas)
Tabla N° 5.9:	Elección del precipitante
Tabla N° 6.1:	Tampones utilizados en la determinación del pH óptimo
Tabla N° 6.2:	Relación entre concentración de sustrato y velocidad de reacción para la determinación de K_m y $V_{m\acute{a}x}$.
Tabla N° 7.1:	Transmitancia de la muestra estándar según la concentración de POD (Cynara Scolymus) en el reactivo
Tabla N° 7.2:	Formulación inicial del reactivo
Tabla N° 7.3:	Evaluación de la estabilidad del reactivo según la oxidación
Tabla N° 7.4:	Evaluación de la estabilidad del reactivo según las concentraciones de glucosa en suero
Tabla N° 7.5:	Estabilizantes utilizados en el reactivo formulado
Tabla N° 7.6:	Compuestos preservantes utilizados en el reactivo
Tabla N° 7.7:	Formulación final del reactivo
Tabla N° 7.8:	Linealidad del reactivo formulado
Tabla N° 7.9:	Control normal para el reactivo formulado
Tabla N° 7.10:	Control patológico para el reactivo formulado
Tabla N° 7.11:	Validación del reactivo formulado
Tabla N° 8.1:	Requerimiento de calor en los tanques mezcladores
Tabla N° 8.2:	Codificación de los equipos
Tabla N° 8.3:	Especificaciones técnicas del molino de discos
Tabla N° 8.4:	Especificaciones técnicas del tanque extractor
Tabla N° 8.5:	Especificaciones técnicas de los tanques mezcladores
Tabla N° 8.6:	Especificaciones técnicas de las centrifugas
Tabla N° 8.7:	Especificaciones técnicas de las bombas centrífugas
Tabla N° 8.8:	Costo de procesamiento
Tabla N° 9.1:	Caracterización de la enzima peroxidasa

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura N° 2.1:** La alcachofa
- Figura N° 3.1:** Efecto de la concentración del sustrato [S] sobre la velocidad de la reacción
- Figura N° 3.2:** Gráfica de Lineweaver – Burk o Gráfica del doble recíproco
- Figura N° 3.3:** Gráfica de Eadie Hofstee
- Figura N° 5.1:** Tiempo de Extracción vs. Concentración de proteínas
- Figura N° 5.2:** Tiempo de Extracción vs. Actividad Relativa
- Figura N° 5.3:** Diagrama de bloques
- Figura N° 6.1:** Espectro de absorción
- Figura N° 6.2:** Curva Estándar
- Figura N° 6.3:** Influencia del pH en la velocidad de reacción
- Figura N° 6.4:** Influencia de la temperatura en la velocidad de reacción
- Figura N° 6.5:** Grafica de Michaelis Menten
- Figura N° 6.6:** Grafica de Lineweaver - Burk
- Figura N° 7.1:** Linealidad en la medición de glucosa
- Figura N° 8.1:** Balance de materia para una planta piloto
- Figura N° 8.2:** Diseño del tanque extractor (M – 100)
- Figura N° 8.3:** Diagrama de flujo para planta piloto
- Figura N° 8.4:** Diagrama de Gantt para la extracción de la enzima peroxidasa

ÍNDICE DE ECUACIONES Y REACCIONES

- (1): Ecuación de Arrhenius
- (2): Reacción de formación del complejo ES
- (3): Reacción de formación de la enzima E
- (4): Ecuación de Michaelis- Menten
- (5): Igualdad entre K_m y $[S]$
- (6): Ecuación de Lineweaver - Burk
- (7): Reacción oxidación del 2-metoxifenol catalizada por la peroxidasa
- (8): Reacción de oxidación de la glucosa
- (9): Reacción de identificación de la glucosa
- (10): Relación para determinación de factor
- (11): Cálculo de la concentración de glucosa

I. INTRODUCCION

La alcachofa es una planta de hojas espinosas que pertenece a la familia asterácea y al género *Cynara* (*Cynara Scolymus*). Es originaria del Mediterráneo y actualmente se cultiva en todo el mundo, especialmente en América. En el Perú se utiliza como producto alimenticio de consumo directo, debido a su gran valor nutricional: 2,9% de proteínas, 10,9% de glúcidos, 160 UI de vitamina A, 51 mg de calcio, 88 mg de fósforo, 1,3 mg de hierro, entre otros, además de contener la enzima peroxidasa.

La peroxidasa es una enzima que cataliza reacciones de óxido - reducción y utiliza peróxido de hidrógeno como sustrato. Se encuentra ampliamente distribuida en el reino vegetal, animal e incluso está presente también en microorganismos vivos. En las células vegetales se encuentra principalmente en paredes celulares, citoplasma y vacuolas (1).

En la actualidad existe un gran interés por la utilización de la peroxidasa, debido a sus múltiples aplicaciones prácticas. Así por ejemplo, en la industria alimentaria, la peroxidasa es utilizada como un indicador en el proceso de escaldado de algunos vegetales, ya que su termorresistencia es más alta que otras enzimas vegetales como la polifeniloxidasas, lipoxigenasa y catalasa.

En las industrias bioquímica y clínica, la peroxidasa es utilizada en kits para análisis clínicos, mientras que en forma altamente purificada se utiliza como marcador en inmunoensayos enzimáticos para la detección de microorganismos patógenos en alimentos y en inmunohistoquímica por lo que su potencial de mercado es muy alto (2).

En la industria química, algunas peroxidases pueden sustituir al cloro en el proceso de blanqueamiento del papel durante su reciclaje y también al

formaldehído utilizado en la fabricación de resinas fenólicas, además de su aplicación en tratamientos de residuos líquidos o suelos contaminados con fenoles, aminas aromáticas, compuestos clorados y/o metales pesados.

Por todo esto, la peroxidasa ha despertado gran interés y las últimas investigaciones buscan nuevas fuentes que la contengan para aprovechar sus propiedades de catalizar con mayor eficacia determinados procesos y posean mayor resistencia a la inactivación.

En este sentido, existen diversos avances como el de Machly, A.C. (1955), que planteó un método para la extracción de la peroxidasa a partir del rábano picante (*Armoracia Lapothifolia*); otros consideraron la extracción a partir de la soja obteniendo peroxidasa de mayor estabilidad a temperaturas elevadas y alta reactividad. Por otro lado, Lee y Cols. (1984) consideraron como fuente vegetal a la coliflor, separando las isoenzimas de la peroxidasa mediante cromatografía de intercambio iónico; así también, Carrillo y Cols. (1984) efectuaron la separación y purificación de isoenzimas de peroxidasa por cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad respectivamente.

Avallone y Cols. (2002) realizaron estudios de la actividad de la peroxidasa, pectinesterasa y polifeniloxidasas presentes en un extracto enzimático de sandía (*Citrullus Vulgaris Schard*). Finalmente, Mejía y Cols. (2003) purificaron la peroxidasa presente en raíces de nabo (*Brassica Napus*) por métodos cromatográficos (cromatografía de intercambio aniónico seguida de filtración en gel).

Sin embargo, pese al avance anterior, los estudios de la peroxidasa en alcachofa no han sido incluídos, a pesar de ser ésta una fuente alternativa importante que la contiene. Por tanto, el objetivo de este trabajo es estudiar y determinar el proceso de extracción de la enzima peroxidasa a

partir de la alcachofa teniendo como parámetros de evaluación el rendimiento y la actividad de la enzima para su utilización en la producción de reactivos de diagnóstico clínico. Para ello, los ensayos se llevaron a cabo en el Laboratorio de producción de reactivos de diagnóstico: **INGENIERÍA MEDICA E.I.R.L (IM.LAB)**.

II. MATERIA PRIMA: ALCACHOFA

2.1. GENERALIDADES

La alcachofa es una planta de nombre científico *Cynara Scolymus* perteneciente a la familia *Asteracea* o *Compositae*.

Algunos autores afirman que la alcachofa es originaria de una amplia zona que cubre Asia Menor, el Norte de África y parte de la Cuenca del Mediterráneo, en donde, de acuerdo a su forma derivada de un cardo: (*Cynara Cardunculus*), es conocida desde hace 2000 años A.C. (3).

La alcachofa se expandió en varios países por diversas vías. Los árabes la llevaron a España, donde tomó el nombre de alcachofa como una derivación fonética del árabe Al Kharshuf. Fue introducida en 1466 a Nápoles donde recibió el nombre de "Carciofi" y comenzó a cultivarse en mayor escala, expandiéndose luego a diversas regiones de Italia. En 1548 pasó de Francia a Inglaterra. A fines del siglo XIX se conoció en Estados Unidos. La migración italiana, consecuencia de la Primera Guerra Mundial, introdujo la alcachofa en Argentina y por la misma vía llegó al Perú. (4).

2.2. TAXONOMIA

La alcachofa se clasifica según los criterios de taxonomía, de acuerdo a lo descrito en la tabla N° 2.1

Tabla N° 2.1: Taxonomía de la alcachofa

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Asteridae</i>
Orden	<i>Asterales</i>
Familia	<i>Asteraceae</i>
Tribu	<i>Cynarae</i>
Género	<i>Cynara</i>
Especie	<i>Cynara Scolymus</i>
Nombre Común	Alcachofa, alcaucil (español), artichoke (inglés), Carciofo (francés).

2.3. MORFOLOGIA

La alcachofa presenta una estructura herbácea de tipo perenne (5) que alcanza una altura promedio de 1,80 m y consta de las siguientes partes:

La raíz principal: Es de tipo napiforme, pivotante y carnosa. A través del tiempo, forma al nivel del cuello una especie de corona, de donde nacen retoños en número variable, según la variedad y edad de la planta. Tiene una altura promedio de 1,50 m (5).

Las hojas: Tienen 1 m de largo aproximadamente. El desarrollo de un cierto número de hojas da origen a la primera cabezuela, la que botánicamente se define como una inflorescencia formada por un conjunto de flores de pedúnculo muy corto insertas en un receptáculo rodeado de brácteas carnosas que protegen las numerosas flores. La cabezuela constituye la parte comercial de la planta (5).

Los frutos: Presentan forma oblonga, y colores más o menos grisáceos con manchas pardas. Los frutos son secos y presentan grandes similitudes con los cardos, diferenciándose de este por su menor tamaño (3). La alcachofa se muestra en la figura N° 2.1

2.4. VARIEDADES DE LA ALCACHOFA

Las variedades de la alcachofa se clasifican según su origen o forma.

2.4.1. Según su origen

Por su origen, las alcachofas se clasifican en italianas, francesas y americanas.

Las alcachofas italianas son llamadas también redondas verdes. Se caracterizan por la forma que adoptan de acuerdo al período en el cual se cosechan; así, las alcachofas que se producen en verano tienden a ser largas, mientras que las de invierno tienden a ser redondas (6).

Las alcachofas francesas y americanas poseen características similares a la italiana; sin embargo las americanas tienen mayor rendimiento y son de fácil empacado, estas características hacen

que esta clase tenga un elevado valor comercial en los Estados Unidos (7).

2.4.2. Según su forma

Por su forma, las alcachofas se clasifican en 2 categorías: criollas y violetas.

Las alcachofas criollas poseen espinas y se caracterizan por tener mayor crecimiento y fructificación, mientras que *las alcachofas violetas o violetas de provenza*, carecen de espinas y desarrollan menos, pero son más precoces y dan frutos de mejor calidad.

En el Perú se cultivan variedades con espinas: criolla costeña y criolla serrana. La primera es ligeramente pequeña, de brácteas delgadas y bien apretadas, mientras que la criolla serrana es de mayor tamaño, brácteas gruesas y no muy apretadas, (6). Ver tabla 2.2



Figura N° 2.1: La alcachofa

Tabla N° 2.2: Variedades de la alcachofa

Clasificación	Variedad	Características (*)				Observación
		Espinas	Desarrollo del botón	Desarrollo de la planta	Descomposición radicular	
Según su origen	Italiana	No	chico	regular	susceptible	Mejor calidad
	Francesa	No	chico	regular	susceptible	
	Americana	No	chico	regular	susceptible	Botón redondo
Según su forma	Criolla serrana	Si	grande	grande	resistente	
	Violeta provenza	No	chico	regular	susceptible	

(*) Características de las variedades más comunes según Montes y Holle (1970).

2.5. CONDICIONES PARA EL CULTIVO

El período de cosecha depende de la estación del año y del estado de plantación. Puede variar en la Costa entre 90 y 120 días, pero la producción normal es de 10 a 15 frutos por planta, es decir, se produce entre 33 000 a 125 000 unidades por hectárea (5).

La cosecha es escalonada, debido a que todas las plantas no florecen a un mismo tiempo, demorando varios meses. Así por ejemplo, la “criolla serrana” se cosecha de Octubre a Enero o Febrero; mientras que la “criolla costeña” de Abril a Junio (6).

El clima y el suelo son algunos factores que determinan las condiciones para un buen cultivo.

Clima: La alcachofa se adapta a condiciones de clima marítimo, mejorando la calidad de éstas, en zonas libres de heladas, primaveras suaves, sin cambios bruscos de temperatura y una alta humedad relativa (8). En tales condiciones, las brácteas se desarrollan adheridas unas con otras formando una flor compacta con desarrollo floral lento; mientras que bajas temperaturas (frío intenso o helada) pueden destruir las yemas florales (7). Así también, la planta desarrolla favorablemente en climas subtropicales, prefiriendo temperaturas de 12 a 20 °C, por tanto se puede cultivar en toda la costa peruana.

Suelo: La alcachofa se acondiciona a un amplio rango de tipos de suelo, desarrollándose mejor en suelos profundos, casi húmedos y bien permeables, en tierra fértil con pH entre 6,4 y 6,8; temperatura entre 12 y 20 °C, provistos de materia orgánica y bien drenada. En los

suelos secos la alcachofa produce cabezuelas duras, coriáceas y de tamaño pequeño.

La alcachofa es una planta que agota mucho el terreno, ya que después de varios años de plantación, el área de los tallos comienza a congestionarse y las plantas pierden vigor, por esta razón se recomienda renovar las plantas cada 4 a 8 años (6).

2.6. CONSERVACION, TRANSPORTE Y COMERCIALIZACION

La alcachofa se debe conservar en un sitio fresco y no húmedo, recubierta con hojas verdes. Montes y Holle (1970) afirman que la descomposición es bastante lenta a temperaturas entre 0 °C y 5 °C; por ello es recomendable que en el día de la cosecha, las alcachofas sean almacenadas a 2 °C, con la finalidad de conservar su máxima calidad (9).

La disminución de la calidad en las hortalizas ya cosechadas se debe a la pérdida de agua y nutrientes que son eliminados durante la transpiración y el secado de su superficie; causando marchites y pérdida de color y del peso.

La pérdida de humedad no puede evitarse completamente por medio de un empaque hermético, ya que la formación de CO₂ y merma de oxígeno aceleran el deterioro de las hortalizas, por esto es recomendable perforar los empaques a fin de prevenir los efectos citados.

Es envasada en canastas y sacos, clasificándola según su tamaño, y cubiertas con hojas de la misma planta, para su mejor conservación durante su transporte. Luego es transportada a los mercados de Lima

(Mercado Mayorista) donde es puesta a la venta por docenas al por mayor y unidades al por menor (10).

Las alcachofas se deben consumir inmediatamente, para evitar que se tornen fibrosas y al mismo tiempo mejorar el gusto y el aspecto (11)

2.7. USOS DE LA ALCACHOFA

La alcachofa es un producto alimenticio, en la cual, las partes carnosas comestibles son la base de la bráctea (escama) así como el corazón de la alcachofa (receptáculo de la inflorescencia). Es utilizada en ensaladas, pasteles y en la industria alimentaria para elaborar encurtidos de aceite (10).

La alcachofa es una hortaliza muy sana, con alto valor nutricional, por lo que se cree que su consumo ayuda a purificar la sangre, disminuir la tasa de colesterol y úrea, tonificar el corazón y restablecer las fuerzas y energías perdidas. También posee propiedades organolépticas que la sitúan entre las más delicadas hortalizas aptas para la preparación de un gran número de recetas exquisitas. La tabla Nº 2.3 muestra la composición y valor nutricional de la alcachofa (contenido promedio en 100 g de una porción); tanto en forma cruda como después de haber sido sometida a cocción (12).

Tabla N° 2.3: Composición y valor nutricional de la alcachofa

CONTENIDO	CRUDA	COCIDA
Agua	85,5%	58,5 %
Proteína	2,9 g	2,9 g
Grasa	0,2 g	0,2 g
Carbohidratos	10,9 g	10,6 g
Fibra	2,4 g	2,4 g
Ceniza	0,8 g	0,6 g
Calcio	51 mg	51 mg
Fósforo	88 mg	69 mg
Hierro	1,3 mg	1,1 mg
Sodio	43 mg	30 mg
Magnesio	20 mg	18 mg
Potasio	430 mg	310 mg
Vitamina A	160 UI	160 UI
Vitamina C	10 mg	8 mg

III. ENZIMAS

3.1. GENERALIDADES

Las enzimas son proteínas globulares que se caracterizan por poseer actividad en la catálisis de reacciones biológicas. Son eficaces catalizando reacciones, alcanzándose velocidades entre 10^8 y 10^{11} veces más rápidas que los catalizadores no enzimáticos correspondientes.

A diferencia de los otros catalizadores, las enzimas poseen alto grado de especificidad para la catálisis de reacciones químico - biológicas, dependiendo de la naturaleza del sustrato, o del tipo de reacciones que catalizan. Es la especificidad enzimática la que determina el destino del compuesto (13).

Acorde a la especificidad de las enzimas por el sustrato, la relación complementaria llave – cerradura brinda el concepto de enlace entre las moléculas de sustrato y un área específica sobre la superficie de la molécula de la enzima (*centro activo* o *sitio catalítico*), dicha correspondencia ocurre mientras se experimenta la reacción catalítica. Así, dos características estructurales son las que determinan la especificidad de una enzima por su sustrato:

- a. El sustrato debe poseer el enlace químico específico o unión, que puede ser atacado por la enzima, y
- b. El sustrato debe tener habitualmente algún grupo funcional, un grupo de unión, que se une a la enzima y ubique en posición a la molécula de sustrato de modo que el enlace susceptible se disponga apropiadamente en relación con el *sitio activo* de la enzima (14).

3.2. CLASIFICACIÓN

La Comisión de enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica introdujo, en 1964, la siguiente clasificación sistemática, que considera seis grupos principales de acuerdo al tipo de reacción implicada:

1. **Oxidoreductasas:** Catalizan una amplia variedad de reacciones de óxido reducción, empleando coenzimas, tales como NAD^+ y NADP^+ , como aceptor de Hidrógeno. Este grupo incluye las enzimas denominadas comúnmente como deshidrogenasas, reductasas, oxidasas, oxigenasas, hidroxilasas y catalasas.
2. **Transferasas:** Catalizan varios tipos de transferencias de grupos de una molécula a otra (transferencia de grupos amino, carboxilo, carbonilo, metilo, glicósilo, acilo y fosforilo). Por ejemplo aminotransferasas (transaminasas).
3. **Hidrolasas:** Catalizan reacciones que implican la ruptura hidrolítica de enlaces químicos, tales como C=O, C-N, C-C. Sus nombres comunes se forman añadiendo el sufijo -asa al nombre del sustrato. Ejemplo: Lipasas, pectidasas, amilasa, maltasa, pectinoesterasa, fosfatasa, ureasa. También pertenecen a este grupo la pepsina, tripsina y quimotripsina.
4. **Liasas:** También catalizan la ruptura de enlaces (C-C, C-S y algunos C-N, excluyendo enlaces peptídicos), pero no por hidrólisis. Ejemplo: Decarboxilasas, citrato-liasa, deshidratasas y aldolasas.

5. **Isomerasas:** Transforman su sustrato de una forma isomérica en otra. Ejemplo: epimerasas, racemasas y mutasas.
6. **Ligasas:** Catalizan la forma de enlace entre C y O, S, N y otros átomos. Generalmente, la energía requerida para la formación de enlace deriva de la hidrólisis del ATP. Las sintetasas y carboxilasas están en este grupo (14).

De acuerdo a la clasificación anterior, la **peroxidasa** pertenece al grupo 1 de las **oxidorreductasas**.

3.3. EXTRACCION DE LAS ENZIMAS

Los alcances referidos a la extracción de enzimas a partir de tejidos vegetales son insuficientes ya que las fuerzas necesarias para destruir la barrera celular son tan elevadas que provocan generalmente, durante los procesos, la desnaturalización de las enzimas deseadas. Además, muchos vegetales contienen compuestos fenólicos que son oxidados enzimáticamente (polifeniloxidasas) por la presencia de oxígeno molecular, formando productos que pueden inactivar rápidamente la enzima a extraer.

Los solventes utilizados frecuentemente en la extracción de enzimas incluyen compuestos que disminuyen su desnaturalización y oxidación, permitiendo conservar su actividad relativa. La tabla N° 3.1 muestra algunos de estos solventes.

Tabla N° 3.1: Compuestos utilizados en la extracción de enzimas

TIPOS DE COMPUESTO	EJEMPLOS	USOS
Compuestos tiólicos	Ditiotreitol	Protección frente a la oxidación de lugares activos con grupos sulfhidrúlicos.
Agentes quelantes	Etilendiamino tetracético Etilglicol amino etil eter tetracético	Quelantes catiónicos, particularmente de metales pesados. El Etilglicol amino etil eter tetracético es específico para el Ca ⁺⁺
Tensoactivos	Polioxitilen sorbitan mono laurato	Solubilización de proteínas unidas a membrana o disrupción de vesículas.
Sustratos	Sustratos	Generalmente ayudan a estabilizar a la enzima frente a la inactivación térmica o frente a pH extremos.
Análogos sustrato	Inhibidores competitivos	
Polímero	Polivinilpirrolidona	Fija compuestos reactivos, utilidad para extractos vegetales.
Modificador	Etilendiamino tetracético Reactivos alquilantes	Inhibidores de enzimas degradantes tales como proteasas y ciertas glicosidasas.

Fuente: Gacesa P., Hubble J. (15)

3.4. FACTORES QUE AFECTAN A LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

La estructura proteica es la que determina la actividad enzimática, por tanto, cualquier causa que perturbe esta estructura puede llevar a una pérdida de actividad. Existen diversos factores que afectan la actividad de la enzima, siendo éstos: la temperatura, el pH y el estado iónico, además de la humedad.

3.4.1. Temperatura

Los cambios ligeros de temperatura suelen tener una considerable influencia en la actividad, debido a que el rango general de temperaturas adecuadas para las reacciones enzimáticas es muy estrecho. La temperatura recomendable para la mayoría de las reacciones enzimáticas usualmente y con pocas excepciones, está entre 20 °C y 40 °C, en donde la actividad es máxima.

El incremento de la temperatura origina aumento en la velocidad de reacción al igual que en otras reacciones químicas, según la ecuación (1) descrita por Arrhenius:

$$K = A e^{-E/RT} \quad \dots\dots (1)$$

Donde: K: constante de la velocidad, A: constante de Arrhenius, E: la energía de activación, R: la constante universal de los gases ideales y T: la temperatura absoluta de la reacción.

Las reacciones catalizadas por enzimas registran valores de energía de activación entre 4 y 20 kcal/mol, mientras que la velocidad de reacción se duplica e incluso triplica con un incremento de 10 °C. Este aumento de temperatura podría

acelerar también la inactivación de la enzima por desnaturalización térmica si se excede del rango permitido experimentalmente para enzimas, a pesar de que algunas enzimas pueden calentarse por encima de 100 °C y conservar aún su estabilidad, otras son menos estables a temperaturas bajas, debido probablemente a las fuerzas hidrofóbicas, cuya intensidad disminuye al disminuir la temperatura, que intervienen en gran medida en el mantenimiento de su *conformación activa* (16).

3.4.2. pH y estado iónico

La actividad enzimática guarda relación con el estado iónico de la molécula; el cual depende del valor de pH existente. Como consecuencia de la variación del pH, las enzimas que poseen cadenas polipeptídicas con grupos capaces de ionizarse (grupos carboxílicos y aminos de los aminoácidos constituyentes) pueden alterar su conformación activa, su capacidad de unión con el sustrato y/o la actividad catalítica de los grupos que forman el *centro activo*. Los grupos ionizables del sustrato también pueden verse afectados por el pH; influyendo en la formación del complejo enzima - sustrato (16).

Por tanto, la actividad de las enzimas es máxima a un valor de pH que difiere del pH del punto isoeléctrico, en el cual, la carga libre neta de las enzimas es cero. Sin embargo, la gran mayoría tiene valor óptimo entre pH 4 y 8. A valores extremos éstas pueden desnaturalizarse (14).

3.4.3. Humedad

El agua es uno de los componentes más importantes en cualquier sistema biológico y constituye el medio adecuado para llevar a cabo la mayoría de reacciones, permitiendo poner en contacto a las diversas moléculas. Además, la reactividad de muchas sustancias depende también de la disociación iónica y de la configuración molecular y, por lo tanto, de la hidratación.

La disponibilidad de agua, medida como actividad del agua, tiene influencia sobre la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas, en las cuales, la actividad enzimática aumenta al aumentar el contenido de "agua libre" y ello ocurre no sólo en las reacciones hidrolíticas, en las que el agua es uno de los reactantes obvios, sino también en las reacciones no hidrolíticas; así, la velocidad de las reacciones enzimáticas se ve fuertemente influida por la naturaleza y concentración de los solventes (14).

3.5. MODELO CINETICO DE REACCIONES ENZIMÁTICAS

Ecuación de Michaelis - Menten

En las reacciones catalizadas por las enzimas se aplican los principios generales de la cinética de las reacciones químicas y se considera la *saturación* con el sustrato dentro de un rango característico.

La figura N° 3.1 muestra el efecto de la concentración del sustrato [S] sobre la velocidad de la reacción ($A \longrightarrow P$) catalizada por la enzima E, en donde se distinguen 3 etapas. En el inicio, a una concentración de sustrato baja, la velocidad inicial de la reacción V_0 es casi proporcional a la [S] y la reacción por tanto es aproximadamente de primer orden con respecto al mismo. La segunda etapa es una zona de orden mixto, ya que, a medida que [S] aumenta, V_0 disminuye y

deja de ser proporcional a [S]. Por último, la tercera etapa revela que un aumento posterior de [S] no afecta la velocidad de reacción que finalmente se aproxima asintóticamente a una velocidad constante. Este intervalo tiene comportamiento de una reacción de orden cero y se dice entonces que la enzima se ha *saturado* con el sustrato.

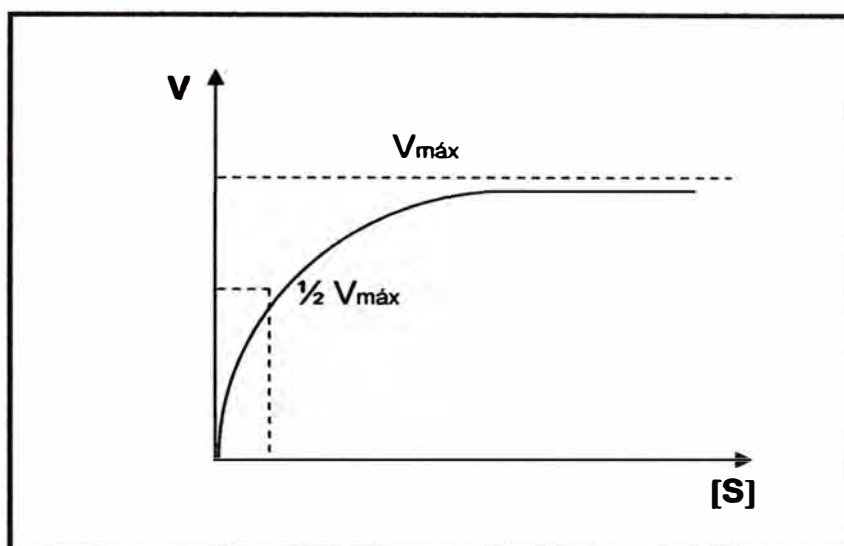


Figura N° 3.1: Efecto de la concentración del sustrato [S] sobre la velocidad de la reacción (V)

El efecto de saturación condujo a algunos investigadores a formular hipótesis de que la enzima y el sustrato reaccionan reversiblemente.

La teoría de Michaelis – Menten supone que la enzima E se combina en primer lugar con el sustrato S para formar el complejo enzima – sustrato ES en una primera etapa; luego éste último, forma la enzima libre E y el producto P en una segunda etapa, tal como se indica en las siguientes etapas de reacción:



Esta teoría se basa en tres suposiciones:

1. La concentración de la enzima [E] es mucho más baja que la concentración de sustrato [S], de modo que el cambio en [S] durante la reacción es insignificante.
2. Aunque ES puede formarse también a partir de E y P por inversión de la reacción (2), la velocidad de la reacción inversa puede despreciarse, ya que se considera que la reacción se inicia en el sentido directo, cuando [S] es muy elevada y [P] es cero, o próximo a éste valor.
3. La liberación de S a partir del complejo ES es mucho más rápido que la liberación de los productos y, en consecuencia, la [E] y [S] pueden considerarse en equilibrio.

Así, la ecuación de Michaelis- Menten viene expresada mediante la ec. (4):

$$V_0 = \frac{V_{\max} * [S]}{K_m + [S]} \quad \dots\dots (4)$$

Esta es la ecuación de la velocidad para una reacción de un solo sustrato catalizada enzimáticamente. Relaciona la velocidad inicial (V_0), la velocidad máxima (V_{\max}) y la concentración inicial del sustrato a través de la constante de Michaelis – Menten (K_m).

La velocidad inicial es máxima cuando [S] sea tan elevada que prácticamente toda la enzima del sistema está presente en forma del complejo ES, es decir, cuando la enzima se haya saturado. Por otro

lado, cuando la velocidad inicial de la reacción V_0 es igual a la mitad de la velocidad máxima ($\frac{1}{2} V_{\text{máx}}$); se obtiene una importante relación matemática. Entonces, reemplazando en la ec. (4), tenemos:

$$K_m = [S] \quad \dots\dots (5)$$

Donde K_m es igual a la concentración del sustrato que permite obtener la mitad de la velocidad máxima. Las dimensiones de K_m para una reacción de un solo sustrato son moles/L, y la constante es independiente de la concentración de la enzima (17).

Puesto que pocas enzimas dan curvas de saturación que permiten evaluar fácilmente $V_{\text{máx}}$ y K_m cuando V_0 es graficada contra $[S]$, es conveniente transformar la expresión de Michaelis Menten mediante la ecuación de linealización dada por **Lineweaver y Burk** que considera los recíprocos como se muestra en la ecuación (6), (18).

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\text{máx}}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{máx}}} \quad \dots\dots (6)$$

Luego, la gráfica de $1/V$ vs. $1/[S]$ resulta una línea recta con pendiente $K_m/V_{\text{máx}}$ e interceptos en ordenada y abscisa de $1/V_{\text{máx}}$ y $-1/K_m$ respectivamente, siendo posible medir directamente $V_{\text{máx}}$ y K_m , tal como se muestra en la Fig. N° 3.2

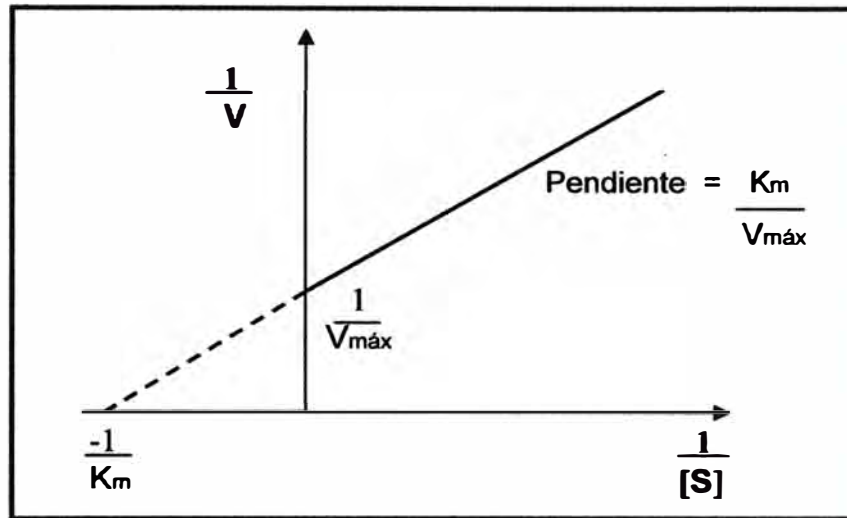


Figura N° 3.2: Gráfica de Lineweaver – Burk o Gráfica del doble recíproco

En la ecuación de Lineweaver- Burk se debe tener en cuenta que al tomar los recíprocos de $[S]$ menores, es difícil determinar V con precisión afectando así la determinación de K_m y $V_{\text{máx}}$, mientras que concentraciones altas de sustrato causan cambios pequeños en V , haciéndose difícil dibujar una recta. En la figura N° 3.3 se presenta otro método de linealización como la gráfica de **Eadie - Hofstee** que corrige las dificultades antes mencionadas.

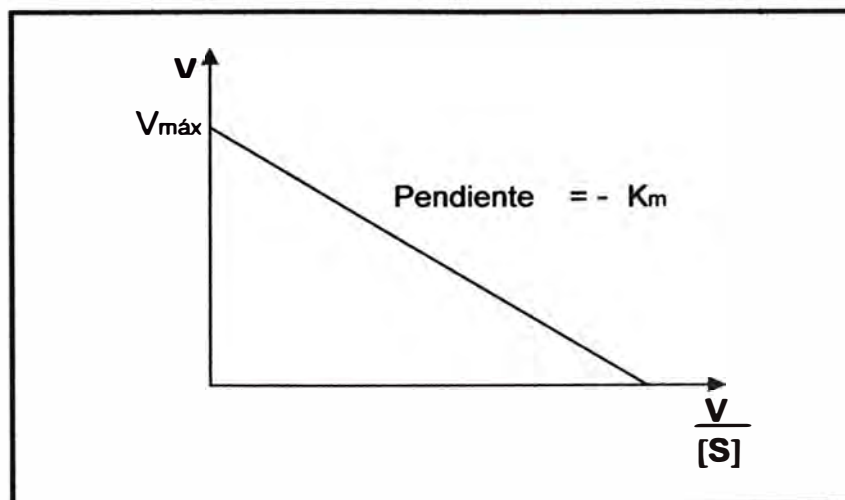


Figura N° 3.3: Gráfica de Eadie Hofstee

3.6. CONSERVACIÓN DE LAS ENZIMAS

La conservación de las enzimas está relacionada con el grado de desnaturalización de las proteínas. Es por ello, que para mantener el estado inicial de la enzima se recomienda adicionar sales neutras y almacenar la disolución de proteína a bajas temperaturas. El mejor método para almacenar las disoluciones de proteínas a lo largo de prolongados periodos de tiempo es vía congelación a 0 °C o a temperaturas aún más bajas, evitando así una apreciable pérdida de su actividad biológica. A estas temperaturas, las bacterias no pueden multiplicarse, con lo que se hace innecesario esterilizar las disoluciones (19).

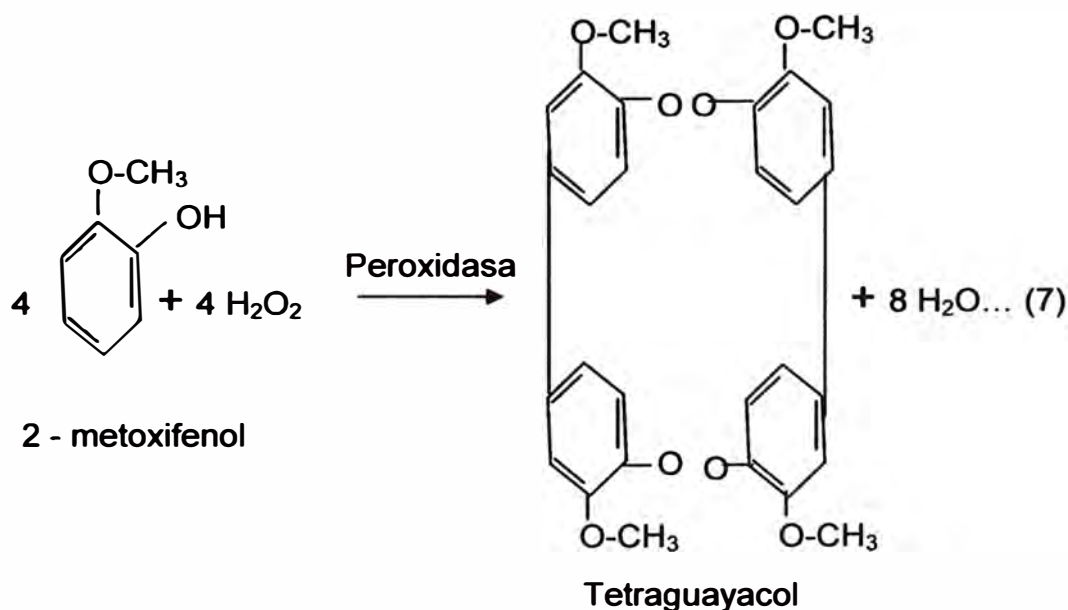
IV. PRODUCTO: PEROXIDASA

4.1. GENERALIDADES

La peroxidasa pertenece al grupo de las oxidoreductasas de acuerdo a la clasificación de las enzimas citada en el Cáp. III. Su estructura contiene el grupo *protohemo* como *grupo prostético* (19), cuyo átomo central de hierro forma complejos con diferentes compuestos, como los de cianuro y la hidroxilamina, inhibiéndose la actividad enzimática.

Esta enzima cataliza reacciones de óxido - reducción mediante la oxidación de ciertos compuestos dadores de Hidrógeno, como fenoles (2-metoxifenol, pirogalol) y aminas aromáticas (o-fenilendiamina) por medio de peróxidos (H_2O_2).

El compuesto oxidable más utilizado por la peroxidasa, es el 2-metoxifenol, el cual es oxidado a un complejo coloreado de tetraguayacol en presencia de peroxidasa (POD) de acuerdo a la siguiente reacción:



La peroxidasa se encuentra ampliamente distribuida en los reinos vegetal y animal; y también está presente en microorganismos vivos. En las células vegetales se encuentra principalmente contenida en las paredes celulares, citoplasma y vacuolas (1).

Como la mayoría de las enzimas, la peroxidasa puede ser inactivada por el calor, sin embargo, es una de las que precisan mayor temperatura y más tiempo para su inactivación. Posee, además, la propiedad peculiar de la regeneración enzimática. Este fenómeno consiste en que al inactivarla por medio del calor recupera parcialmente su actividad después de un cierto tiempo. Esto ha sido explicado aduciendo que la fracción proteica de la enzima sufre una desnaturalización sólo parcial, con pérdida de su estructura terciaria cuando el calor se aplica un tiempo muy corto, produciéndose luego una reversión de la proteína a su estado normal por recombinación de sus grupos hidrógenos o sulfhidrúlicos (14).

4.2. COMPOSICION

Todas las enzimas son proteínas con longitudes de cadena de 100 a 2 500 residuos de aminoácidos. La peroxidasa, tiene peso molecular igual a 54 500 dalton y se encuentra constituida por los siguientes aminoácidos. Ver la tabla N° 4.1

Tabla N° 4.1: Composición de la enzima peroxidasa según el contenido de aminoácidos

Aminoácido	Peroxidasa (rábano japonés)^f B*
Glicina (Gly)	6
Alanina (Ala)	64
Valina (Val)	20
Leucina (Leu)	36
Isoleucina (Ile)	15
Prolina (Pro)	17
Fenilalanina (Phe)	18
Tirosina (Tyr)	3
Triptófano (Trp)	2
Serina (Ser)	51
Treonina (Thr)	27
Cistina (Cys)	10
Metionina (Met)	4
Arginina (Arg)	11
Histidina (His)	4
Lisina (Lys)	7
Ácido aspártico (Asp)	51
Ácido glutámico (Glu)	26
Grupo amino (NH ₂)	50
Total	422

*B** : Unidades de aminoácidos por molécula

f : Contiene también 12 unidades de hidroxiprolina, 1 hemo, 35 de manosa, 11 de xilosa, 4 de arabinosa y 15 de hexosamina.

4.3. CLASIFICACIÓN

Las enzimas peroxidasas se clasifican en tres grupos, los cuales se detallan a continuación:

- ***Ferriprotoporfirina peroxidasa***: Poseen color café e incluyen peroxidasas presentes en plantas grandes, animales y microorganismos. Todas estas peroxidasas contienen *ferriprotoporfirina III* como grupo prostético. La alcachofa representa una de las plantas que contiene esta clase de POD.
- ***Verdoperoxidasas***: Poseen color verde y son consideradas muy importante en comidas. Se encuentra principalmente en la leche, como lactoperoxidasa y en animales, según lo reportado por Karlson (1965). El grupo prostético de esta enzima es un núcleo de hierro de porfirina que no es ferriprotoporfirina III (20).
- ***Flavoproteínas***: Las cuales han sido purificadas de estreptococos y de algunos tejidos animales. El grupo prostético es el nucleótido FAD (Flavin-Adenina-Dinucleotido).

4.4. USOS DE LA PEROXIDASA

La peroxidasa tiene múltiples usos tanto en laboratorio clínico como a nivel industrial, siendo la más utilizada aquella extraída de la raíz del rábano picante.

4.4.1. *En Bioquímica clínica*

La peroxidasa se emplea en la detección de virus tan conocidos como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) causante del SIDA mediante asociación de anticuerpos específicos a esta enzima, cuya reacción genera el cromógeno por el que se mide la extensión de unión del anticuerpo; obteniéndose excelentes sensibilidades, sin recurrir al uso de radioactividad como en el radioinmunoanálisis (16).

La peroxidasa también se utiliza ampliamente como enzima acoplada en los ensayos para determinación y cuantificación de glucosa, ácido úrico, colesterol y triglicéridos contenidos en fluidos biológicos; catalizando las siguientes reacciones de óxido – reducción:

- *Reacción para la determinación de Glucosa*



- *Reacción para la determinación de Ácido Úrico*



- *Reacción para la determinación de Colesterol*



- *Reacción para la determinación de Triglicéridos*





En las reacciones anteriores, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) formado se cuantifica en presencia de peroxidasa, mediante procedimientos colorimétricos sensibles según la siguiente reacción:



4.4.1.1. IMPORTANCIA DE LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA

La glucosa es un monosacárido (hexosa o dextrosa) que se encuentra en los alimentos, especialmente en frutas y constituye un producto del metabolismo de los carbohidratos en el proceso digestivo, juntamente con la fructosa y galactosa. Estos monosacáridos son absorbidos por la mucosa del duodeno y de la primera parte del intestino delgado para su ingreso al plasma; en donde la glucosa circulante es captada principalmente por el hígado, músculos y tejidos.

La glucosa excedente en el hígado (constituida en parte, por la fructosa y galactosa transformada) es convertida mediante fosforilación a glucógeno (gluconeogénesis), reserva energética para el organismo y, en ácidos grasos, almacenados como lípidos; que posteriormente serán utilizados como fuente de energía gracias a la transformación de glucógeno en glucosa (glucólisis) según las necesidades del organismo.

Por otro lado, la utilización de glucosa aumenta considerablemente por efectos de la insulina (hormona secretada por el páncreas a través de las células insulares), probablemente porque ésta facilita la absorción de la glucosa al hígado, músculos y tejidos; acelera la gluconeogénesis, facilita la transformación del exceso de glucosa en lípidos y aumenta la oxidación de glucosa. Por tanto, cuando existe una disminución de insulina, debido a algún trastorno de las células insulares, no es posible controlar los niveles de glucosa en sangre (se absorbe menos glucosa a las células) ni almacenar el glucógeno (aumenta la gluconeogénesis hepática).

El aumento de glucosa en el torrente sanguíneo provoca la *diabetes mellitus*, síndrome caracterizado por una secreción anormal (disminución) de insulina que se refleja en una tendencia a la *hiperglicemia* (niveles altos de glucosa en sangre), asociada con la *glucosuria* (presencia de glucosa en la orina).

Por el contrario, el exceso de insulina en sangre (por sobredosis o por sobreproducción) produce una *hipoglicemia* que puede llevar al shock.

La tabla N° 4.2 muestra el intervalo de referencia para los niveles normales de glucosa expresado en mg/dL.

Tabla N° 4.2: Intervalo de referencia para niveles de glucosa

	Valores Normales
En niños y adultos	70 – 110 mg/dL

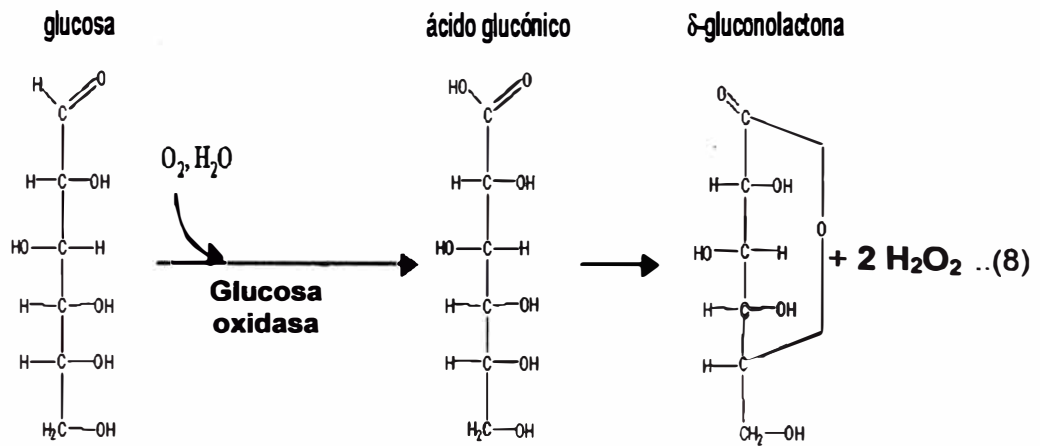
Fuente: Guerci A. (21)

El diagnóstico de las enfermedades mencionadas anteriormente se realiza conociendo los niveles de glucosa; por lo tanto, en este trabajo se formula un reactivo que permita cuantificar los niveles de glucosa presentes en muestras de suero.

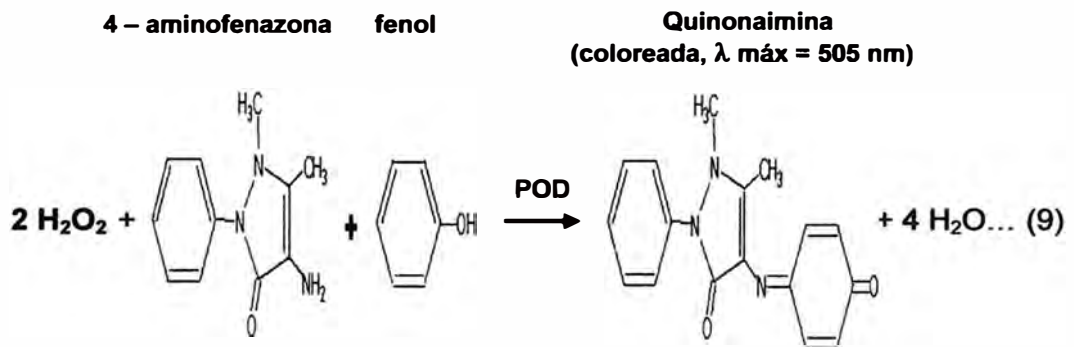
4.4.1.2. MECANISMO DE REACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE GLUCOSA

La reacción de identificación de glucosa se lleva a cabo en un monorreactivo mediante un mecanismo de acoplamiento que comprende dos *secuencias de reacción* como se muestra a continuación:

En la primera reacción, la glucosa es oxidada por el oxígeno molecular formando peróxido de hidrógeno y δ -Gluconolactona; éste último, formado a partir del ácido glucónico (producto intermediario). La reacción ocurre en presencia de la glucosa oxidasa como catalizador, de acuerdo a la siguiente reacción:



En la segunda reacción, el peróxido de hidrógeno formado reacciona posteriormente con la 4 - aminofenazona en presencia de fenol obteniéndose como producto el compuesto (mono-imino-p-benzoquinona) - 4 fenazona. La reacción ocurre en presencia de la enzima peroxidasa como catalizador de acuerdo a la siguiente reacción:



De acuerdo al mecanismo descrito anteriormente, la cantidad de producto formado es proporcional a la concentración de glucosa presente en una muestra y se manifiesta con el desarrollo de un color rosado, el cual se mide espectrofotométricamente, a una longitud de onda de 505 nm cuyo ancho de banda permite una mejor absorción para dicho color.

La cuantificación de la glucosa se lleva a cabo mediante la siguiente técnica: Se marcan tres tubos de ensayo con las letras B (blanco de reactivo), E (estándar) y P (problema), colocándose en ellos, lo que se indica en la Tabla N° 4.3

Tabla N° 4.3: Técnica para la cuantificación de glucosa

	B	E	P
Estándar	—	10 µL	—
Problema	---	---	10 µL
Reactivo	1mL	1mL	1 mL

Los tres tubos: B, E y P se homogenizan y se incuban a 37 °C durante 10 min. Al cabo de este tiempo, el espectrofotómetro es calibrado con el blanco de reactivo (B) a una longitud de onda de 505 nm y se realiza la lectura de los valores de transmitancia (T) de los tubos marcados con “E” y “P”. Estos valores son expresados en absorbancia “Ae” y “Ap” ($A = 2 + \log (1/T)$), para el estándar (E) y problema (P) respectivamente, proporcionales a la concentración de glucosa. El valor de “Ae” es utilizado en la determinación del **factor**.

Los cálculos para determinar la concentración de glucosa se realiza por el método del factor, basado en la Ley de Lambert & Beer; considerándose una concentración estándar (Ce) igual a 100 mg/dL de acuerdo a las referencias bibliográficos. El *factor* viene expresado por la siguiente relación:

$$\text{Factor} = [C_e] / A_e \quad \dots (10)$$

En donde:

[Ce]: Concentración del estándar "E" (100 mg/dL)

Ae: Absorbancia del estándar "E"

La concentración de una muestra problema se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$[Cp] = \text{Factor} * Ap \quad \dots (11)$$

En donde:

[Cp]: Concentración del problema "P"

Ap: Absorbancia del problema "P"

Para la determinación del factor, C_e/A_e (mg/dL), es recomendable que el valor de transmitancia correspondiente al estándar se encuentre en un intervalo de 40 – 60, esto permite reproducir valores de concentración de glucosa (niveles bajos y altos de glucosa) en una muestra problema, hasta un valor de linealidad tal, que depende de las características del reactivo empleado. Para valores de concentración por encima de dicha linealidad es necesario diluir la muestra.

Luego, el factor se determina al obtenerse un valor de transmitancia próximo al promedio recomendable ($T = 50$), correspondiente a una concentración estándar de 100 mg/dL de glucosa.

4.4.2. A nivel industrial

En la generación de productos de interés biotecnológico e industrial. La POD sustituye al formaldehído en la fabricación de

resinas fenólicas. Otros productos de interés lo constituyen los adhesivos, antioxidantes y protectores de radiación magnética, colorantes alimentarios y componentes bioactivos de detergentes.

En la industria alimentaria. Es utilizada como indicador en el proceso de escaldado de algunos vegetales, debido a su alta termorresistencia en comparación a otras enzimas, como la polifeniloxidasas, lipoxigenasa y catalasa.

En la industria del papel. La POD sustituye al cloro en el proceso de blanqueamiento en el reciclaje de papel.

En el tratamiento de efluentes contaminantes. La Comisión Científica de la Unión Europea afirma que la POD contribuye en la conservación del medio ambiente. Así por ejemplo, las peroxidasas permiten catalizar la oxidación de compuestos fenólicos residuales, y de alta toxicidad; derivados en los procesos productivos de la industria cervecera; en presencia de Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2), generando radicales libres que reaccionan entre sí para formar polímeros fenólicos. Estos son insolubles y fácilmente eliminables por floculación y sedimentación.

Las peroxidasas del rábano picante (*Armoracia Rustica L.*) y frijol de soya (*Glicine Max.*) han sido las más estudiadas a este respecto con altos porcentajes de eliminación de compuestos fenólicos.

4.5. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN: CUALITATIVO Y CUANTITATIVO

- **Método cualitativo**

La POD se identifica cualitativamente mediante modificación del procedimiento descrito por Nevesky (1950), colocando 20 μ L de solución enzimática; 0,5 mL de 2- metoxifenol al 1% (en etanol) y 0,5 mL de H₂O₂ al 3% en un tubo de ensayo y homogenizando la disolución. El desarrollo de un color pardo indica la presencia de POD.

- **Método cuantitativo**

La POD se determina cuantitativamente mediante modificación del Método descrito por Civello et al. basándose en la actividad relativa medida espectrofotométricamente. Este método emplea una muestra problema, una muestra patrón y un blanco. La muestra problema se obtiene colocando 20 μ L de solución enzimática, 2 mL de buffer fosfato 30 mM (pH = 6), 1 mL de 2 - metoxifenol (20 mM) y 1 mL de H₂O₂ (4,4 mM) en un tubo de ensayo, y homogenizando la muestra. Los cambios de absorbancia son seguidos a 25 °C en un espectrofotómetro UV- visible a 470 nm a intervalos de un minuto.

La muestra patrón se obtiene colocando 20 μ L de solución enzimática, 3 mL de buffer fosfato (pH = 6) y 1 mL de 2- metoxifenol, la muestra se homogeniza y se lee el valor de absorbancia. El agua destilada se utiliza como blanco en la calibración del equipo.

La actividad relativa se expresa como unidades de actividad por mL de muestra. Una unidad de actividad corresponde a la cantidad de enzima que produce 1 μmol de tetraguayacol por minuto bajo condiciones estándares (factor de extinción $\epsilon_{470} = 5\,200\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Si se desea expresar la actividad por gramo de muestra es necesario determinar el contenido de proteínas presentes en la solución enzimática.

V. DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1. DESCRIPCION DEL PROCESO

El proceso de extracción de la peroxidasa (POD) a partir de la alcachofa comprende las siguientes etapas:

- a. **Selección.-** Las alcachofas (materia prima) se seleccionan por apariencia visual, prefiriéndose las de aspecto fresco. Las alcachofas aptas se refrigeran a temperatura entre 2 y 8 °C.
- b. **Lavado.-** Se lleva a cabo mediante inmersión de las alcachofas en agua clorada, de concentración igual a 10 ppm y luego son enjuagadas con agua clorada de 1ppm.
- c. **Molienda.-** Se reduce el tamaño de partículas de las alcachofas (libre de impurezas) obteniéndose partículas de 4 mm.
- d. **Extracción.-** El solvente utilizado es buffer acetato de sodio (pH = 4,5). La relación de concentración entre soluto - solvente es de 1:4 (25% en peso de soluto). La extracción se realiza con agitación a 300 rpm durante 2 horas. El extracto enzimático se separa del refinado mediante filtración y luego se centrifuga a 10 000 rpm durante 10 min eliminándose las partículas de menor tamaño. La extracción comprende 2 etapas, la primera de 2 horas y la segunda de 1 hora. Las etapas se realizan a temperaturas entre 2 y 8 °C.
- e. **Precipitación.-** El extracto enzimático se precipita en dos etapas. En la primera etapa, se trata con sulfato de amonio al 30% en peso y la disolución resultante se centrifuga a 10 000 rpm durante 30 min. El sobrenadante contiene la enzima peroxidasa (POD) y

el precipitado contiene la enzima polifeniloxidasasa (PFO) que se elimina. En la segunda etapa, la precipitación se realiza con adición de sulfato de amonio al 75%, la disolución se centrifuga a 10 000 rpm durante 40 min, obteniéndose la enzima POD en el precipitado y descartándose el sobrenadante.

- f. **Purificación.-** Los precipitados de POD obtenidos en ambas etapas de extracción se mezclan y diluyen en una proporción 1:20. La solución diluida de POD se hace pasar a través de un lecho de resina (columna de intercambio iónico). La enzima POD purificada se mantiene en refrigeración entre 2 y 8 °C.

Las etapas del proceso descrito anteriormente incluyen los parámetros y condiciones establecidos mediante ensayos realizados en el laboratorio de acuerdo al ítem 5.2.

5.2. ETAPAS PARA EL PROCESO DE EXTRACCIÓN

Las etapas, condiciones y parámetros para llevar a cabo la extracción de la peroxidasa (POD) son desarrolladas a continuación:

5.2.1. SELECCIÓN

La selección tiene por objeto proveer de alcachofas “aptas” para la extracción de la enzima POD.

La materia prima considerada para el estudio es la alcachofa de variedad “*criolla serrana*”, adquirida en el Mercado Mayorista de Lima (provenientes del Departamento de Junín) y guardada en recipientes refrigerados a temperatura entre 2 y 8 °C para

mantenerla en buen estado de conservación, durante el traslado hacia el laboratorio.

El criterio en la selección es por apariencia visual, prefiriéndose aquellas de aspecto fresco sin presencia de abolladuras ni en proceso de descomposición. Sin embargo, las alcachofas que presentan deterioro, por ejemplo en brácteas, son separadas del resto de su composición, por corte manual.

La cantidad de alcachofa utilizada como muestra es de 100 g (base de cálculo que representa el 100%), de los cuales el 0,80% en peso, se elimina durante la selección.

Se debe tener en cuenta que los porcentajes están expresados respecto a la corriente de entrada en cada etapa.

5.2.2. LAVADO

La finalidad de esta etapa es eliminar las impurezas presentes en las alcachofas. Para ello, el lavado se lleva a cabo por inmersión en agua clorada, de concentración igual a 10 ppm durante 2 minutos. Posteriormente, las alcachofas se enjuagan con agua clorada de concentración igual a 1 ppm.

En esta etapa, las impurezas representan el 0,25% en peso.

5.2.3. MOLIENDA

La reducción del tamaño de partícula de la alcachofa (materia prima) se realiza con el objeto de facilitar el proceso de extracción.

Los tamaños de partícula ensayados son tomados de referencias bibliográficas, realizándose la reducción de tamaño con un molino de discos marca Corona a longitudes de 4, 8 y 12 mm aproximadamente mediante regulación de la distancia entre discos.

Luego, cada tamaño de partícula se pone en contacto con el solvente y se realiza la extracción de la POD en las mismas condiciones. Posteriormente, se determina y compara los valores de actividad relativa de la POD obtenida en cada caso.

La Tabla N° 5.1 muestra los resultados de actividad relativa de la POD en relación con el tamaño de partícula.

Tabla N° 5.1: Relación entre tamaño de partícula y actividad relativa

Tamaño (mm) Prueba	Actividad relativa de la POD (U/mL)		
	4	8	12
1	26,519	22,382	21,246
2	27,654	22,416	21,382
3	27,467	22,450	21,314
Promedio	27,213	22,416	21,314

Los resultados de la tabla N° 5.1 muestran una mayor actividad relativa con un tamaño de partícula de 4 mm (27,213 U/mL) a diferencia de los obtenidos con tamaños de 8 y 12 mm (22,416 y 21,314 U/mL respectivamente).

La extracción con tamaños de partícula de 4 mm permite aumentar el área de contacto entre partículas soluto - solvente, solubilizándose mayor cantidad de proteínas, asociadas al valor de actividad relativa obtenido.

El tamaño de partícula para la extracción de la enzima POD es de 4 mm.

La merma correspondiente a esta etapa representa el 0,37% en peso.

5.2.4. EXTRACCIÓN

Los factores que influyen en el proceso de extracción son evaluados y determinados con el objeto de extraer el mayor contenido de proteínas solubles presentes en la materia prima. Los factores considerados son: solvente, concentración de soluto, tiempo de extracción y número de etapas para la extracción.

5.2.4.1. SELECCIÓN DEL SOLVENTE

Los solventes ensayados son recopilados de bibliografías que hacen mención a la extracción de enzimas, en forma particular, de la enzima POD. Sin embargo, es necesario realizar modificaciones de algunos solventes en el laboratorio, mediante la adición de compuestos que minimicen la desnaturalización, oxidación y degradación de las enzimas.

Los solventes ensayados son designados con las letras: A, B y C. Sus composiciones se indican en la siguiente tabla:

Tabla N° 5.2: Composición de los solventes utilizados en la extracción

Solvente	pH	Composición
A	4,5	Acetato de sodio (CH_3COONa) 0,05 M, Ácido Ascórbico 0,03 M, EDTA (Etilendiaminotetraacético sal sódica dihidratado) 0,01 M, Cloruro de Sodio (NaCl) 1%, y Polivinilpirrolidona al 1%.
B	6,0	Fosfato Disódico (Na_2HPO_4) 0,02 M, Ácido Ascórbico 0,028 M, Polioxitilen sorbitan mono laurato 0,1%.
C	7,0	Fosfato Disódico (Na_2HPO_4) 0,1M; EDTA 0,05 M, Cloruro de Sodio (NaCl) 5%.

La tabla N° 5.3 muestra las ventajas y desventajas de los solventes de acuerdo a las propiedades de los compuestos incluidos en los mismos.

El solvente se selecciona según su capacidad para extraer preferentemente la enzima POD permitiendo mejorar los valores de actividad relativa.

Tabla N° 5.3: Ventajas y desventajas de los solventes utilizados en la extracción

SOLVENTE	VENTAJAS	DESVENTAJAS
A	<ul style="list-style-type: none">▪ Retarda la oxidación de la POD.▪ Contiene compuestos secuestrantes de fenoles.▪ Contiene agentes quelantes de cationes.	<ul style="list-style-type: none">▪ La separación de los componentes requiere de cromatografía.
B	<ul style="list-style-type: none">▪ Proporciona un medio estable para la extracción.▪ Disminuye la tensión superficial mejorando la extracción.	<ul style="list-style-type: none">▪ Disminuye la selectividad de extracción de la POD.
C	<ul style="list-style-type: none">▪ Contiene agentes quelantes de cationes.▪ Evita la formación de bacterias.▪ Las cargas iónicas de este medio permiten la solubilización de las proteínas.	<ul style="list-style-type: none">▪ La oxidación de la POD aumenta.

La tabla N° 5.4 muestra los resultados de actividad relativa en relación con el solvente utilizado.

Tabla N° 5.4: Relación entre solvente y actividad relativa

		Actividad relativa de la POD (U/mL)		
		A	B	C
Solvente	Prueba			
1		28,523	23,264	20,410
2		27,934	23,015	19,815
3		28,115	23,612	19,546
Promedio		28,191	23,297	19,924

Los resultados de la tabla N° 5.4 muestran que la actividad relativa es mayor empleando el solvente A (28,191 U/mL), a diferencia de los solventes B y C (23,297 y 19,924 U/mL respectivamente) utilizados en la extracción.

El solvente A permite solubilizar y conservar la POD durante la extracción, obteniéndose un mayor valor de actividad relativa.

5.2.4.2. CONCENTRACIÓN DE SOLUTO

La concentración del soluto respecto al solvente se determina con la finalidad de aprovechar la máxima capacidad de extracción soluto/solvente y evitar así la saturación.

La extracción de la POD se realiza en concentraciones de soluto al 15, 25 y 35% en peso (respecto al solvente). Luego, se determina y compara los valores de actividad relativa de la POD obtenida.

Los resultados de actividad relativa en relación con la concentración del soluto se muestran en la tabla N° 5.5.

Tabla N° 5.5: Relación entre concentración de soluto y actividad relativa

Concentración (%) Prueba	Actividad relativa de la POD (U/mL)		
	15	25	35
1	19,600	20,063	17,356
2	19,500	20,384	13,993
3	18,600	20,260	16,024
Promedio	19,200	20,224	15,791

El soluto al 25% (w/w) permite obtener un mayor valor de actividad relativa (20,224 U/mL) en comparación con las concentraciones al 15 y 35% (19,200 y 15,791 U/mL respectivamente).

La extracción con una concentración al 25% permite aprovechar la máxima capacidad de extracción del solvente y reducir la saturación del mismo por presencia de otras proteínas distintas a la POD.

5.2.4.3. TIEMPO DE EXTRACCIÓN

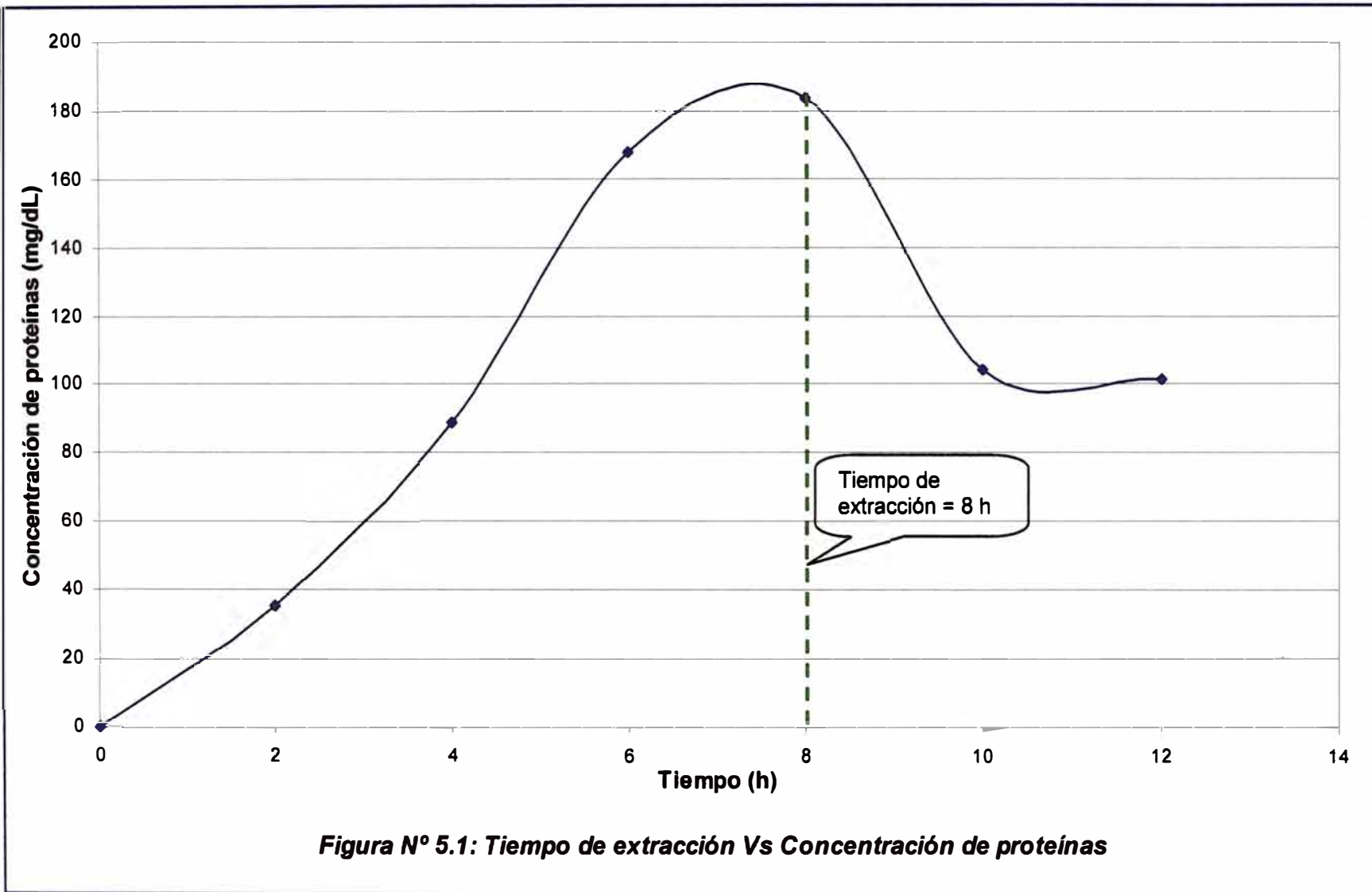
El tiempo de contacto entre soluto y solvente se determina teniendo en cuenta la cantidad de proteínas que se solubilizan durante la extracción y los valores de actividad relativa de la POD.

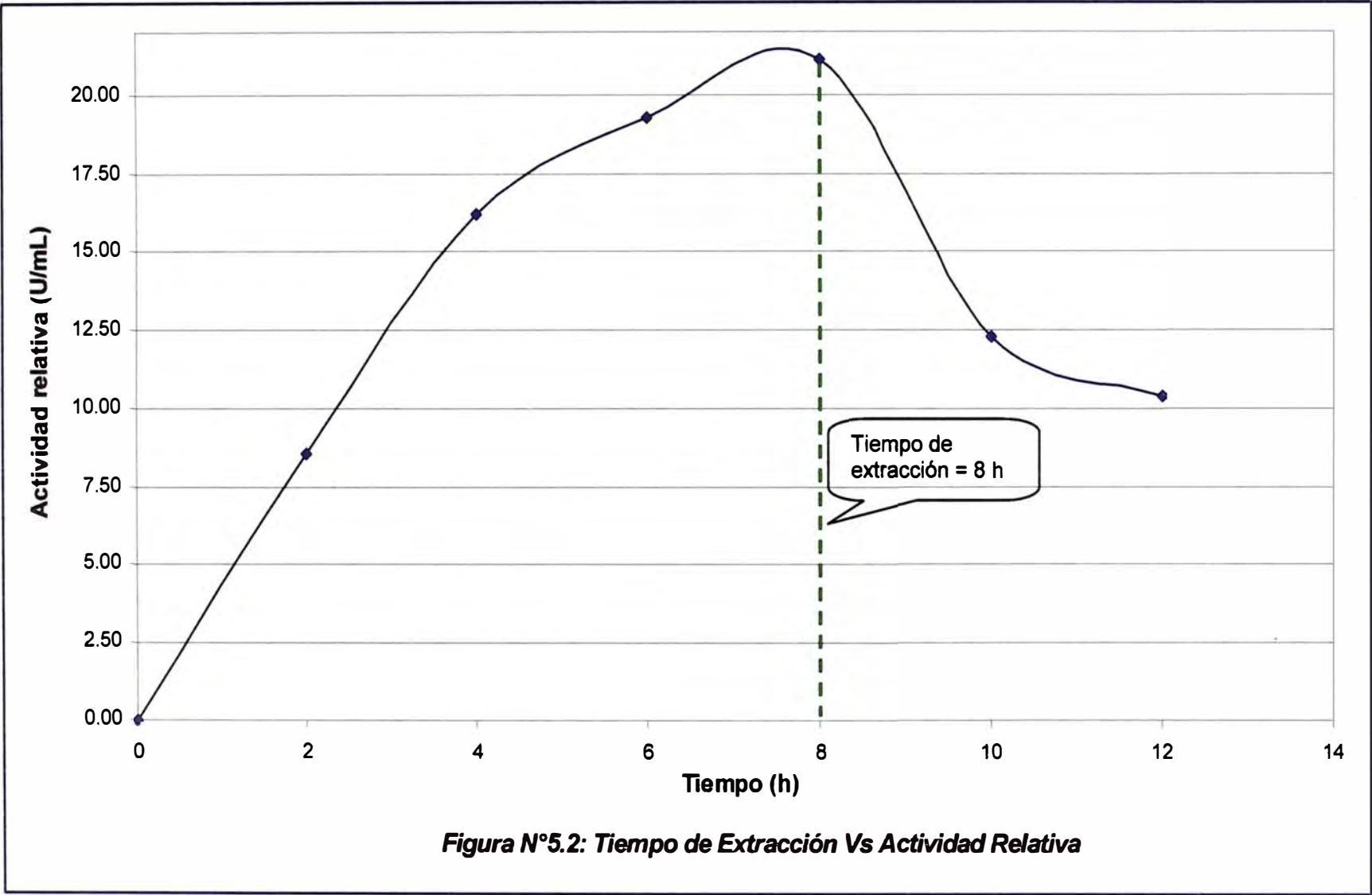
La extracción se realiza con una concentración al 25%, por 12 horas y durante este periodo de tiempo, se toman volúmenes iguales de extracto enzimático cada 2 horas. La cantidad de proteínas y actividad relativa de la POD son determinadas para cada intervalo de tiempo. Los resultados se muestran en la tabla N° 5.6.

**Tabla N° 5.6: Relación entre tiempo de extracción -
Concentración de proteínas y actividad relativa**

Tiempo (h)	Concentración de proteínas (mg/dL)	Actividad relativa (U/mL)
2	35,6321	8,564
4	89,0468	11,619
6	167,6733	19,239
8	183,5317	21,105
10	104,2037	12,292
12	101,6503	10,360

Los resultados de concentración de proteínas y actividad relativa de la tabla N° 5.6 son ploteados respecto al tiempo de extracción, en las figuras N° 5.1 y N° 5.2.





La figura N° 5.1 indica que la cantidad de proteínas aumenta hasta las 8 horas de extracción, a partir del cual empieza a disminuir, debido que en un mayor tiempo, las proteínas sufren desnaturalización.

La figura N° 5.2 muestra que la enzima POD pierde actividad a un tiempo de extracción superior a 8 horas debido a la oxidación de la enzima. La oxidación se da como resultado de la disminución del ácido ascórbico utilizado como antioxidante al convertirse en ácido dihidroascórbico, en el medio de extracción. Además, las proteínas sufren un proceso de desnaturalización, provocando disminución en la actividad relativa de la enzima.

El tiempo de extracción (en una etapa) es de 8 horas para obtener la mayor concentración de proteínas y actividad relativa de POD.

5.2.4.4. NUMERO DE ETAPAS DE EXTRACCIÓN

El número de etapas se determina con la finalidad de reducir el tiempo de extracción (en la práctica se requieren períodos cortos de tiempo) y mejorar la calidad de la enzima POD.

La extracción se lleva a cabo en 3 etapas utilizándose una concentración de soluto al 25%. La primera etapa se realiza con un tiempo de extracción de 4 horas, obteniéndose el primer extracto enzimático, a partir del cual se obtiene la primera fracción de POD. La segunda y

tercera etapa de extracción se realizan luego de 4 y 3 horas respectivamente.

Posteriormente, se determina y compara los resultados de actividad relativa de las fracciones de POD obtenidas en cada etapa.

Los resultados de actividad de POD se muestran en la tabla N° 5.7a.

Tabla N° 5.7a: Relación entre número de etapas y actividad relativa (tiempos: 4-4-3 h)

Etapas de extracción	Tiempo (h)	Actividad relativa (U/mL)	% Actividad relativa (*)
1	4	19,524	100,0
2	4	5,493	28,1
3	3	0,341	1,7

(*) El % se expresa como fracción de la primera etapa de extracción.

Tabla N° 5.7b: Relación entre número de etapas y actividad relativa (tiempos: 4-3-2 h)

Etapas de extracción	Tiempo (h)	Actividad relativa (U/mL)	% Actividad relativa (*)
1	4	19,815	100,0
2	3	8,562	43,2
3	2	0,844	4,2

(*) El % se expresa como fracción de la primera etapa de extracción.

Tabla N° 5.7c: Relación entre número de etapas y actividad relativa (tiempos: 3-2-1 h)

Etapas de extracción	Tiempo (h)	Actividad relativa (U/mL)	% Actividad relativa (*)
1	3	23,184	100,0
2	2	11,125	48,0
3	1	1,235	5,3

(*) El % se expresa como fracción de la primera etapa de extracción.

Las tablas N° 5.7a, 5.7b y 5.7c muestran que la actividad relativa en una tercera etapa disminuye apreciablemente en comparación a las dos primeras (1,7%, 4,2% y 5,3%), debido a que la mayor parte de la enzima ya ha sido extraída. Asimismo, se muestra que el valor de actividad relativa aumenta al disminuir los intervalos de tiempo entre cada etapa.

Por lo tanto se descarta el empleo de una tercera etapa de extracción.

Las tablas N° 5.8a, 5.8b y 5.8c muestran los resultados de actividad relativa obtenidos al realizar la extracción en dos etapas.

Tabla N° 5.8a: Relación entre número de etapas y actividad relativa (tiempos: 4-3 h)

Etapas de extracción	Tiempo (h)	Actividad relativa (U/mL)	% Actividad relativa (*)
1	4	20,494	100,0
2	3	6,012	29,3

(*) El % se expresa como fracción de la primera etapa de extracción.

Tabla N° 5.8b: Relación entre número de etapas y actividad relativa (tiempos: 3-2 h)

Etapas de extracción	Tiempo (h)	Actividad relativa (U/mL)	% Actividad relativa (*)
1	3	26,353	100,0
2	2	8,648	32,8

(*) El % se expresa como fracción de la primera etapa de extracción.

Tabla N° 5.8c: Relación entre número de etapas y actividad relativa (tiempos: 2-1 h)

Etapas de extracción	Tiempo (h)	Actividad relativa (U/mL)	% Actividad relativa (*)
1	2	27,758	100,0
2	1	9,126	32,9

(*) El % se expresa como fracción de la primera etapa de extracción.

La primera etapa de extracción se lleva al cabo de 2 horas y la segunda luego de 1 hora; debido a que no se observa variación en los porcentajes de actividad al realizar una segunda etapa de extracción al cabo de 2 horas. (Ver tablas N° 5.8b y 5.8c).

Los valores de actividad relativa aumentan con la disminución del tiempo de extracción de 8 a 3 horas.

Los porcentajes de extracto enzimático obtenidos en la primera y segunda etapa de extracción representan el 63,91% y 67,89% respectivamente.

5.2.5. PRECIPITACIÓN

La precipitación tiene por finalidad separar la enzima POD del extracto enzimático, basándose en la diferencia de solubilidades que presentan las proteínas a diferentes valores de pH, empleando concentraciones variables de la sal precipitante.

La obtención de la POD se realiza mediante dos precipitaciones sucesivas: En la primera, se consigue la eliminación de la polifeniloxidasasa (PFO); y en la segunda, la obtención de la POD.

5.2.5.1. ELECCIÓN DEL PRECIPITANTE

Entre los precipitantes propuestos se consideran las sales neutras divalentes debido a su mayor influencia en la solubilidad de las proteínas. Por tanto, las sales utilizadas en la precipitación son: Cloruro de Calcio (CaCl_2), Sulfato de Amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) y Sulfito de Sodio (Na_2SO_3).

Las sales son añadidas a tres tubos de ensayo que contienen iguales volúmenes de extracto enzimático, observándose la formación de precipitado.

Los resultados de la precipitación de POD son determinados cualitativamente de acuerdo al método descrito en el ítem 4.5, y se muestran en la Tabla N° 5.9.

Tabla N° 5.9: Elección del precipitante

Desarrollo de Color Sal precipitante	Ninguno	Medio	Intenso
CaCl ₂	+		
(NH ₄) ₂ SO ₄			+
Na ₂ SO ₃		+	

El precipitado formado por adición del sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) contiene la enzima POD; ya que cualitativamente, desarrolla un color *pardo intenso* característico de ésta. Asimismo, el precipitado obtenido con sulfito de sodio (Na₂SO₃) desarrolla un color de intensidad "*media*" indicando menor presencia de POD. Finalmente, con el cloruro de calcio (CaCl₂) se obtiene la formación de una emulsión blanquecina sin desarrollo del color característico (ausencia de POD).

La precipitación de POD se realiza con sulfato de amonio, ya que adicionalmente, no ejerce efectos perjudiciales en la mayoría de las enzimas, tiene un bajo costo y, en algunos casos presenta efecto estabilizante.

5.2.5.2. CONCENTRACIÓN DEL PRECIPITANTE

Las concentraciones de sal utilizadas en la precipitación de la PFO y POD son consideradas a partir de referencias bibliográficas, tomándose los valores promedios de los intervalos de concentración propuestos.

Las concentraciones de sulfato de amonio utilizadas en las precipitaciones de la PFO y POD son del 30% y 75% respectivamente.

Los precipitados de POD obtenidos en la primera y segunda etapa de extracción corresponden al 0,34% y 0,12% respectivamente.

La enzima peroxidasa obtenida por precipitación se diluye, realizándose luego una *etapa de purificación* con la finalidad de eliminar la sal presente. La POD purificada representa 0,13% en peso.

5.3. BALANCE DE MATERIA

El balance de materia se basa en la cantidad de materia prima (alcachofa) utilizada a nivel laboratorio.

Base: 100,00 g de alcachofa

- **En la selección**

Entrada:

Alcachofa 100,00 g

Salidas:

Alcachofa no apta 0,80 g

Alcachofa apta 99,20 g

100,00 g

- **En el lavado**

Entrada:

Alcachofa apta 99,20 g

Salidas:

Alcachofa limpia 98,95 g

Impurezas 0,25 g

99,20 g

- **En la molienda**

Entrada:

Alcachofa limpia 98,95 g

Salidas:

Merma 0,37 g

Alcachofa molida 98,58 g

98,95 g

- **En la extracción:**

Primera etapa de extracción

Entrada:

Alcachofa molida 98,58 g

Solvente 394,32 g

492,90 g

Salida:

R1 (alc. + ste.) 177,89 g

E1 (E.E) 315,01 g

492,90 g

Segunda etapa de extracción

Entrada:

R1 (alc.+ ste.)	177,89 g
Solvente	<u>394,32 g</u>
		572,21 g

Salida:

R2 (alc.+ ste.)	183,74 g
E2 (E.E)	<u>388,47 g</u>
		572,21 g

• **En la precipitación:**

Primera etapa de precipitación de la PFO

Entrada:

E1 (E.E)	315,01 g
Sal ((NH ₄) ₂ SO ₄)	<u>135,00 g</u>
		450,01 g

Salida:

D1-1 (E.E. de POD)	371,71 g
PFO + Ste + sal	<u>78,30 g</u>
		450,01 g

Segunda etapa de precipitación de la PFO

Entrada:

E2 (E.E)	388,47 g
Sal ((NH ₄) ₂ SO ₄)	<u>166,49 g</u>
		554,96 g

Salida:

D2-1 (E.E. de POD)	477,88 g
PFO + Ste + sal	<u>77,08 g</u>
		554,96 g

Primera etapa de precipitación de la POD

Entrada:

D1-1 (E.E. de POD)	371,71 g
Sal ((NH ₄) ₂ SO ₄)	304,13 g
	<u>675,84 g</u>

Salida:

D1-2 (ste + sal)	673,52 g
POD + ste + sal	2,32 g
	<u>675,84 g</u>

Segunda etapa de precipitación de la POD

Entrada:

D2-1 (E.E. de POD)	477,88 g
Sal ((NH ₄) ₂ SO ₄)	390,99 g
	<u>868,87 g</u>

Salida:

D2-2 (ste + sal)	867,85 g
POD + ste + sal	1,02 g
	<u>868,87 g</u>

• **En la purificación:**

Entrada:

POD + ste + sal	3,34 g
-----------------------	--------

Salida:

(NH ₄) ₂ SO ₄ (separada)	3,21 g
POD (producto final)	0,13 g

5.4. DIAGRAMA DE BLOQUES

En relación a las etapas de proceso definidas anteriormente, se presenta el diagrama de bloques en el cual se detallan las cantidades utilizadas y el porcentaje de recuperación de la enzima POD (Ver figura N° 5.3).

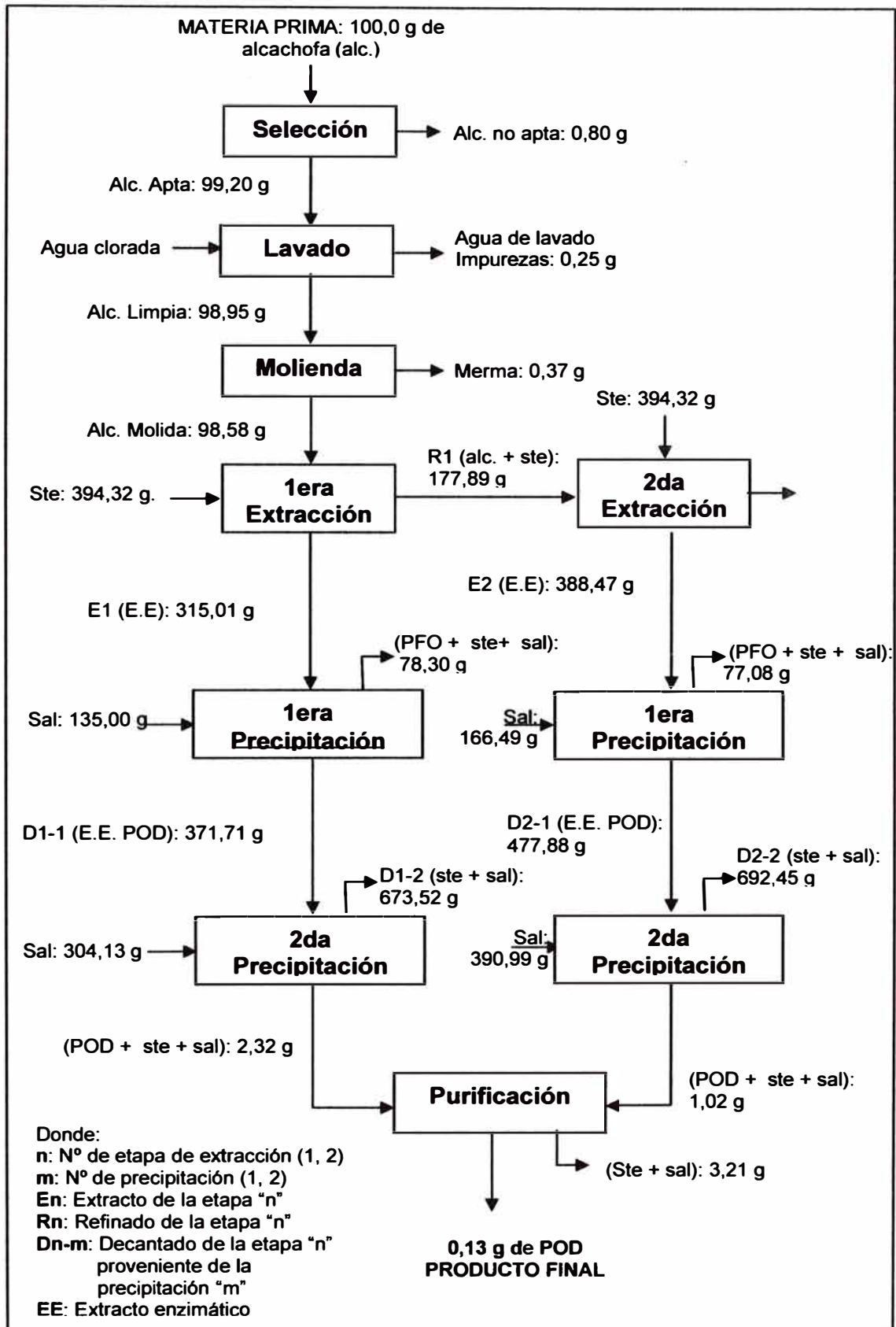


Figura N° 5.3: Diagrama de bloques

VI. ACCION DE LA PEROXIDASA

La velocidad de reacción de la POD (expresada como actividad relativa) fue estudiada considerando la influencia del pH, la temperatura y la concentración de la enzima. La reacción enzimática es seguida espectrofotométricamente, para ello, es necesario conocer la longitud de onda de máxima absorción, que permita evidenciar la formación de producto.

Los valores de la constante cinética y velocidad de reacción son determinados a partir de las ecuaciones de Michaelis Menten y de Lineweaver Burk.

6.1.LONGITUD DE ONDA MÁXIMA

La aparición de producto (o desaparición de sustrato) en la reacción catalizada por la POD da lugar a la formación de un cromóforo con desarrollo de color que puede ser medido espectrofotométricamente (en valores de absorbancia) en un intervalo de longitud de onda. Sin embargo, existe un valor de longitud de onda de máxima absorción que permite reproducir mejores resultados debido a la mayor absorción de radiación monocromática.

El valor de longitud de onda de máxima absorción se determina experimentalmente, colocando 20 μL de POD, 2 mL de buffer fosfato (pH = 6), 1 mL de 2- metoxifenol (20 mM) y 1 mL de H_2O_2 (4,4 mM) en un tubo de ensayo. La reacción se lleva a cabo durante 10 min con el desarrollo gradual de un color pardo. Luego, se realiza la lectura de la absorbancia a diferentes longitudes de onda, calibrándose el espectrofotómetro con agua destilada (blanco) entre cada medición.

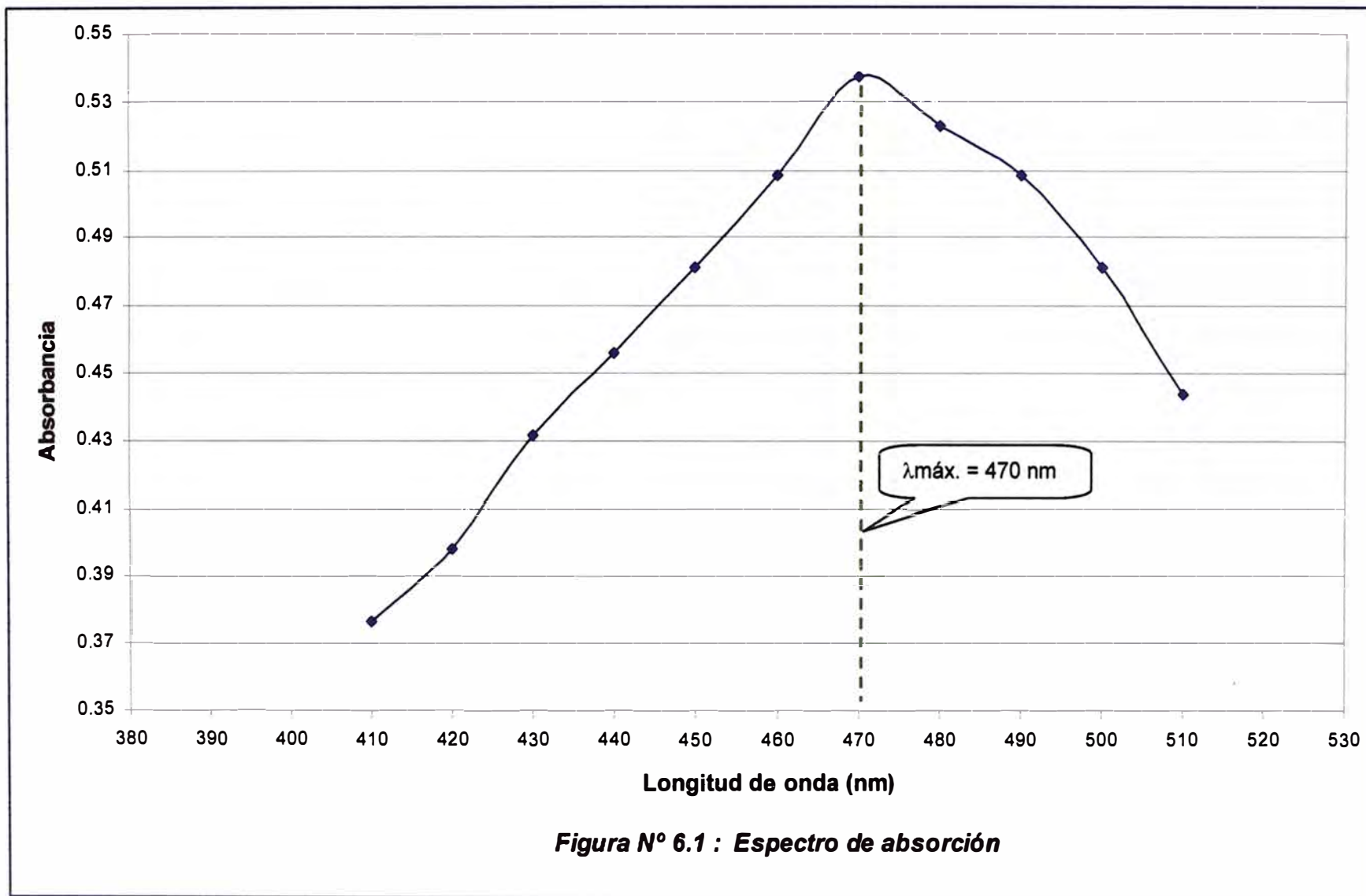
El espectro de absorción que relaciona la absorbancia (densidad óptica) y la longitud de onda de máxima absorción se muestran en la figura N° 6.1, en ella se observa que la longitud de onda máxima (λ_{\max}) es de 470 nm.

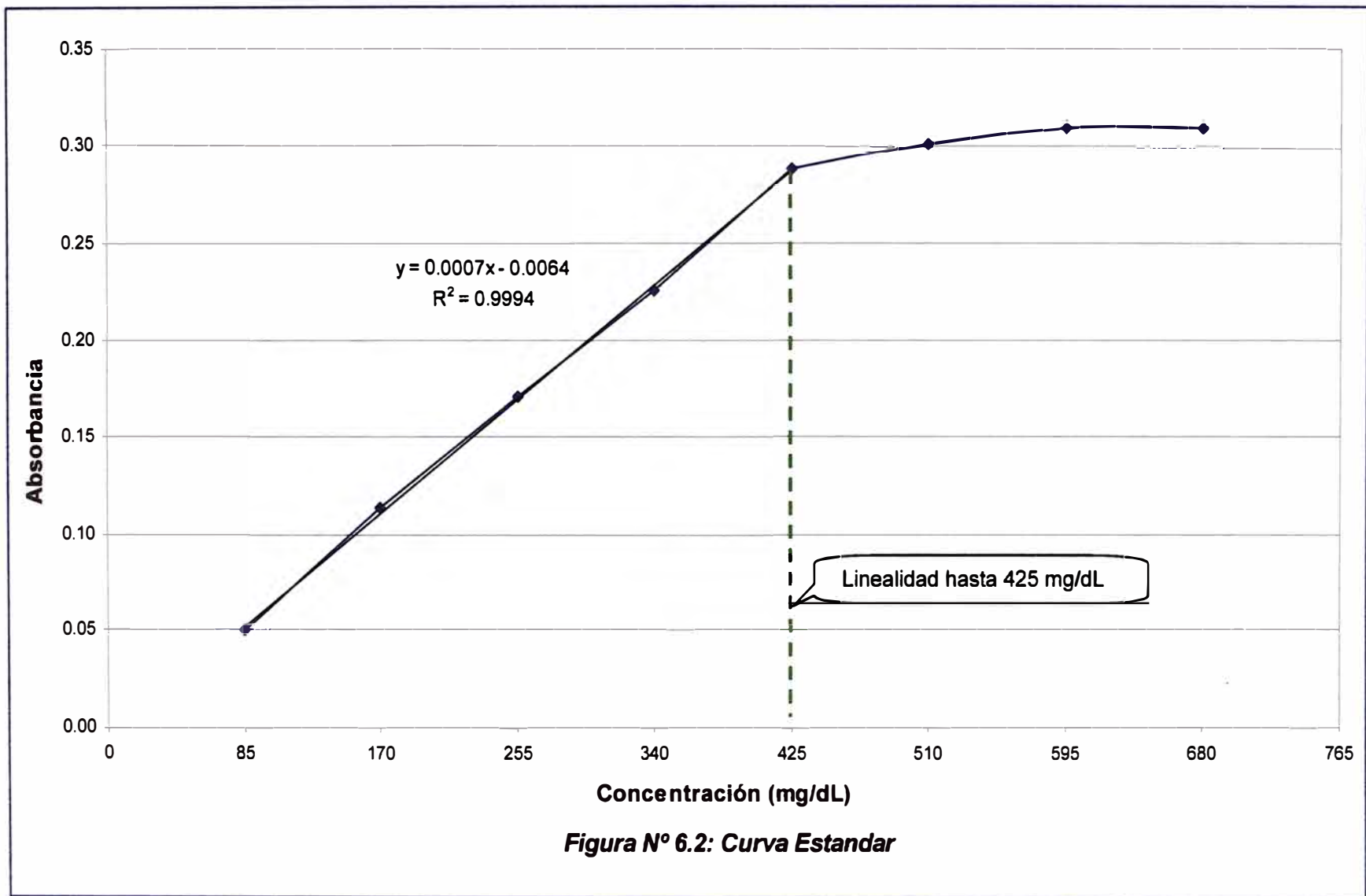
6.2. CURVA ESTANDAR

La concentración de la POD utilizada en la reacción es determinada considerando su comportamiento lineal según la Ley de Lambert & Beer, que plantea la relación directamente proporcional entre la concentración y absorbancia para un intervalo específico de concentración.

La reacción se lleva a cabo con diferentes concentraciones de POD, obteniéndose valores de absorbancia que son medidos a una longitud de onda de 470 nm. (Ver figura N° 6.2)

La figura N° 6.2 muestra que la POD tiene un comportamiento lineal hasta una concentración de 425 mg/dL, permitiendo el aumento de la velocidad de reacción enzimática en forma proporcional hasta este valor. A mayor concentración de enzima, los valores de absorbancia tienden a una constante debido a que el sustrato se satura.





6.3. INFLUENCIA DEL pH EN LA VELOCIDAD DE REACCIÓN

La velocidad de reacción varía de acuerdo a los valores de pH, ya que las enzimas son activas en un rango limitado del mismo. En condiciones de pH extremos, algunas propiedades de la enzima (*su conformación, capacidad de unión con el sustrato y la actividad de los grupos que forman el centro activo*) y del sustrato (*grupos ionizables*) varían en forma desfavorable para la reacción.

El valor de pH para la reacción de la POD se determina según los resultados obtenidos al evaluarse la actividad relativa frente a diferentes tampones mostrados en la tabla N° 6.1.

Tabla N° 6.1: Tampones utilizados en la determinación del pH óptimo

Tampón	Rango de pH
KCl/HCl	2,0 – 3,0
Acetato	4,0 – 5,6
Fosfato	6,0 – 8,0
Glicina/NaOH	9,0
Carbonato	10,0

La figura N° 6.3 muestra los valores de pH versus la actividad relativa, observándose un valor mayor de actividad (22,4 U/mL) a un pH igual a 6,0 para la reacción catalizada por POD.

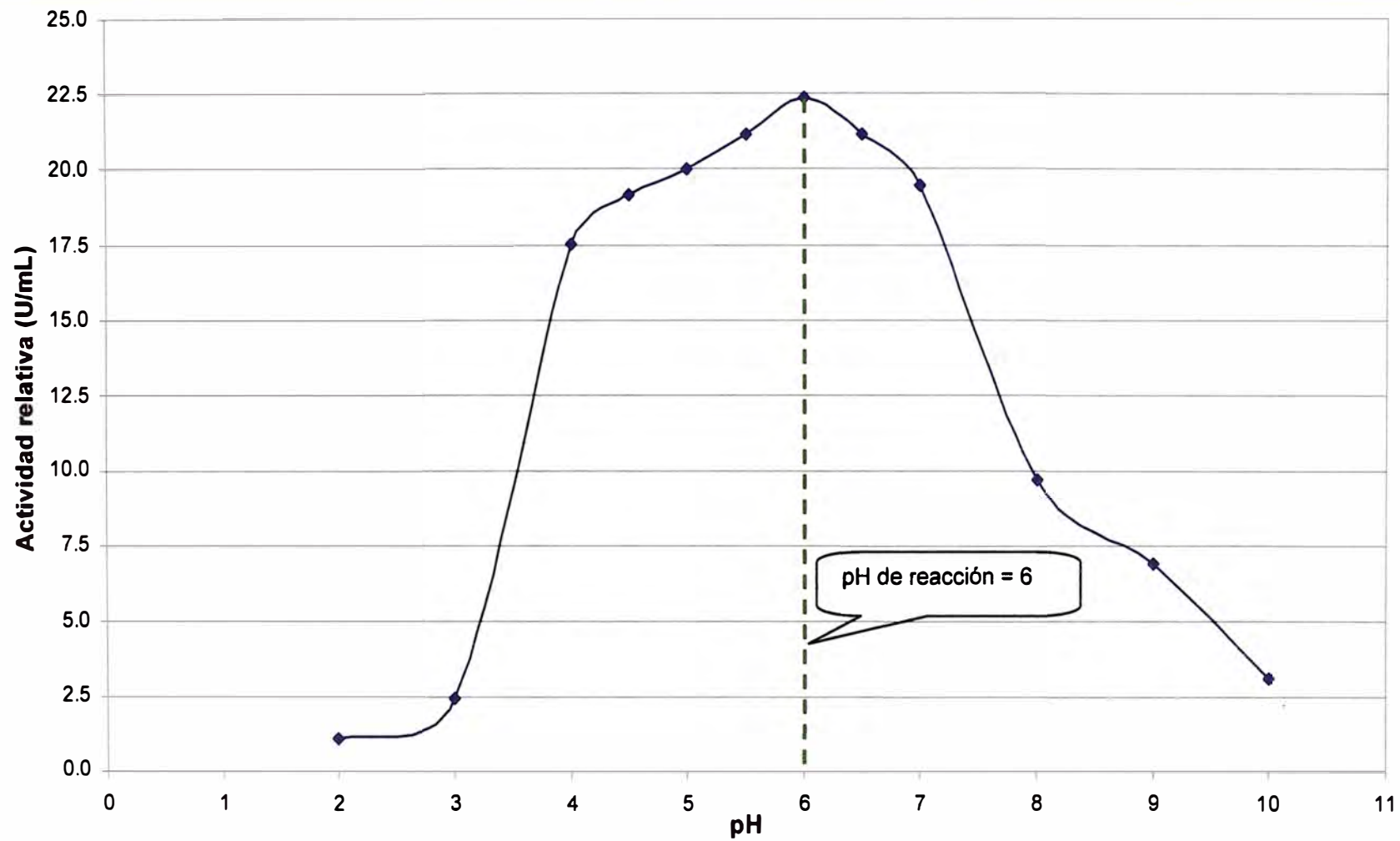


Figura N° 6.3: Influencia del pH en la Velocidad de reacción

6.4. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA VELOCIDAD DE REACCIÓN

El incremento de la temperatura, en la mayoría de reacciones enzimáticas, provoca un aumento en la velocidad de reacción. Sin embargo, se debe considerar que con valores extremos de temperatura las enzimas se desnaturalizan, afectando dicha velocidad (la velocidad se expresa en función de la actividad relativa). La actividad relativa de la POD se mide en un intervalo de 10 a 80 °C. (Ver figura N° 6.4).

En la figura N° 6.4 se observa que la temperatura en la cual existe una mayor velocidad de reacción es de 40 °C, obteniéndose un mayor valor de actividad relativa (15,6 U/mL).

6.5. CONSTANTE CINÉTICA DE LA REACCIÓN (K_m)

La constante cinética K_m indica la afinidad de la enzima por el sustrato y es numéricamente igual a la concentración de sustrato que permite obtener la mitad de la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$). Este valor es utilizado en el análisis de enzimas para obtener un $V_{m\acute{a}x}$ proporcional a la cantidad de enzima activa presente en una muestra. Usualmente se emplean concentraciones de sustrato múltiplo de K_m .

La velocidad de formación del color pardo puede ser utilizada como medida de la actividad relativa de la enzima por lecturas espectrofotométricas de las absorbancias en relación con el tiempo.

En esta prueba se varia la concentración de sustrato hasta 30 mM y se utiliza una concentración de enzima constante.

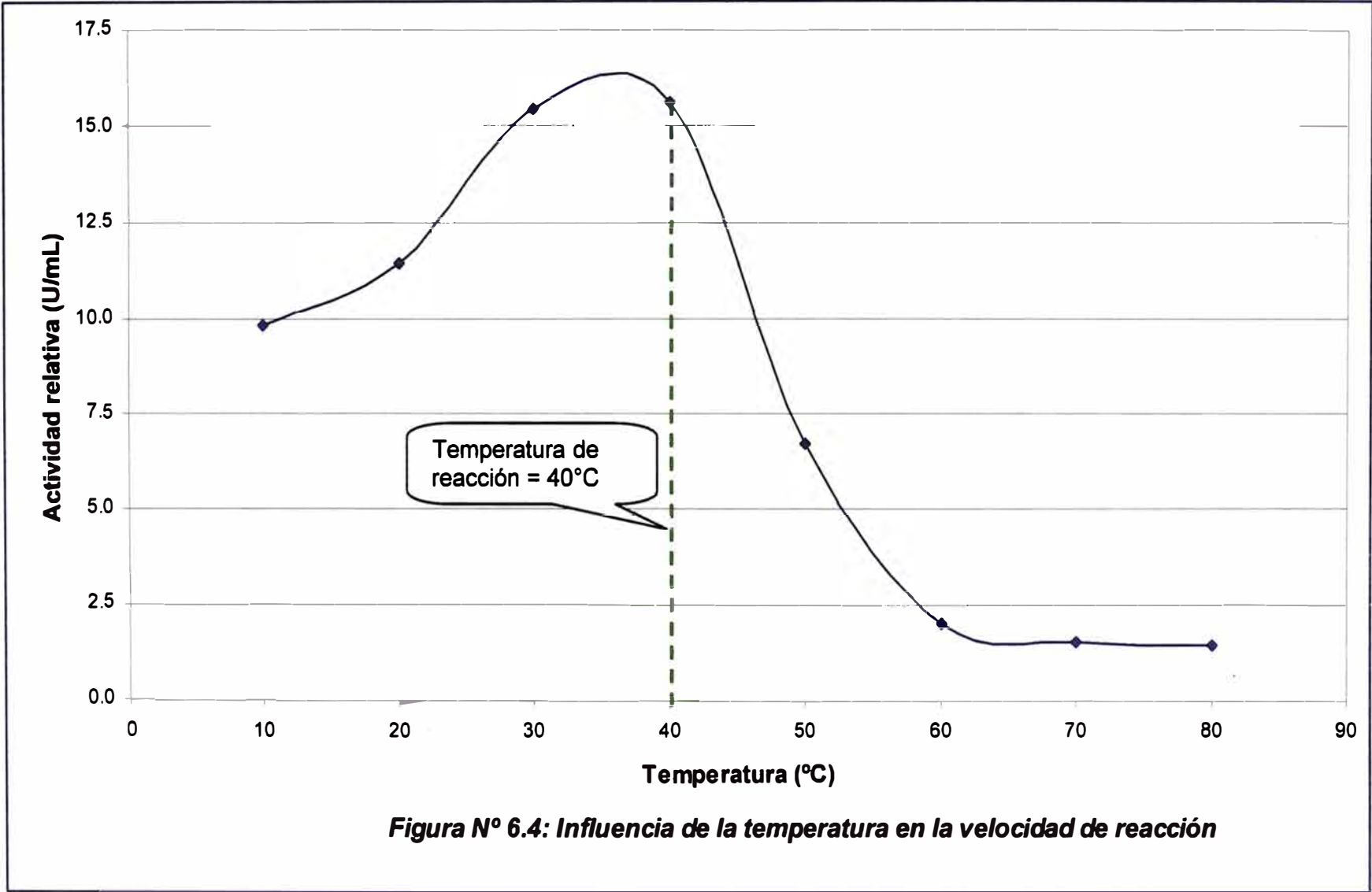


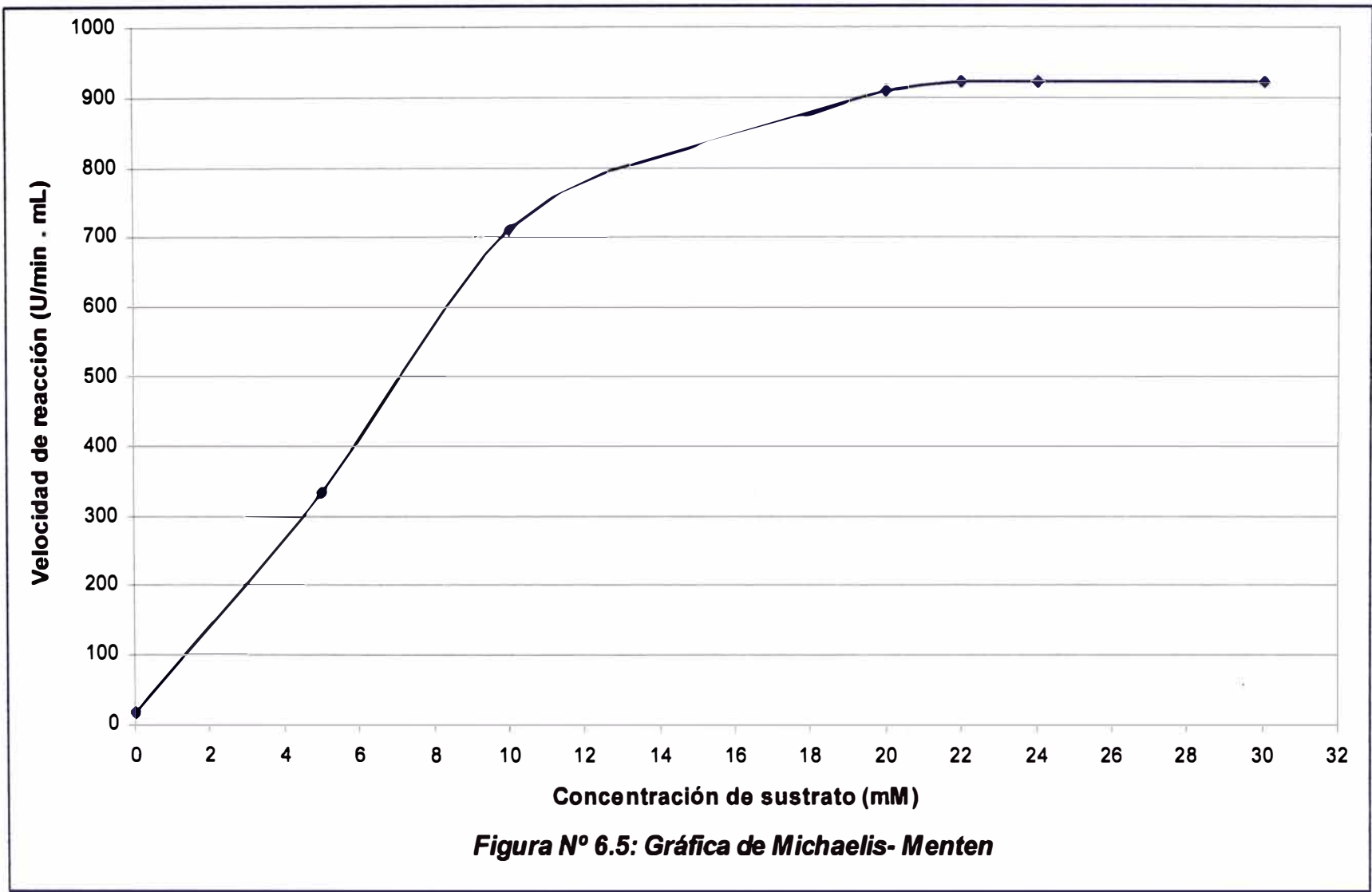
Figura N° 6.4: Influencia de la temperatura en la velocidad de reacción

Luego, se mide la velocidad de reacción (V) en función al valor de actividad relativa por unidad de tiempo. El valor de K_m se determina gráficamente empleando la ecuación de Michaelis Menten (Ver figura N° 6.5) y la ecuación de Lineweaver – Burk (Ver figura N° 6.6), esta última permite corregir el valor de $V_{m\acute{a}x}$ y K_m de acuerdo a la teoría descrita en el ítem 3.5. La tabla N° 6.2 muestra las velocidades a las diferentes concentraciones.

Tabla N° 6.2: Relación entre concentración de sustrato y velocidad de reacción para determinación de K_m y $V_{m\acute{a}x}$

Concentración de sustrato (mM)	Velocidad (U/mL . min)
0	16,5
5	334,5
10	710,8
15	834,4
18	877,6
20	910,5
22	921,9
24	921,9
30	921,9

Finalmente, del gráfico de Michaelis Menten se obtiene que el valor de K_m es igual a 6,70 mM, mientras que de acuerdo a la ecuación de Lineweaver – Burk, K_m es igual a 6,99 mM. Por lo tanto, la velocidad variará proporcionalmente hasta este valor de concentración (K_m).



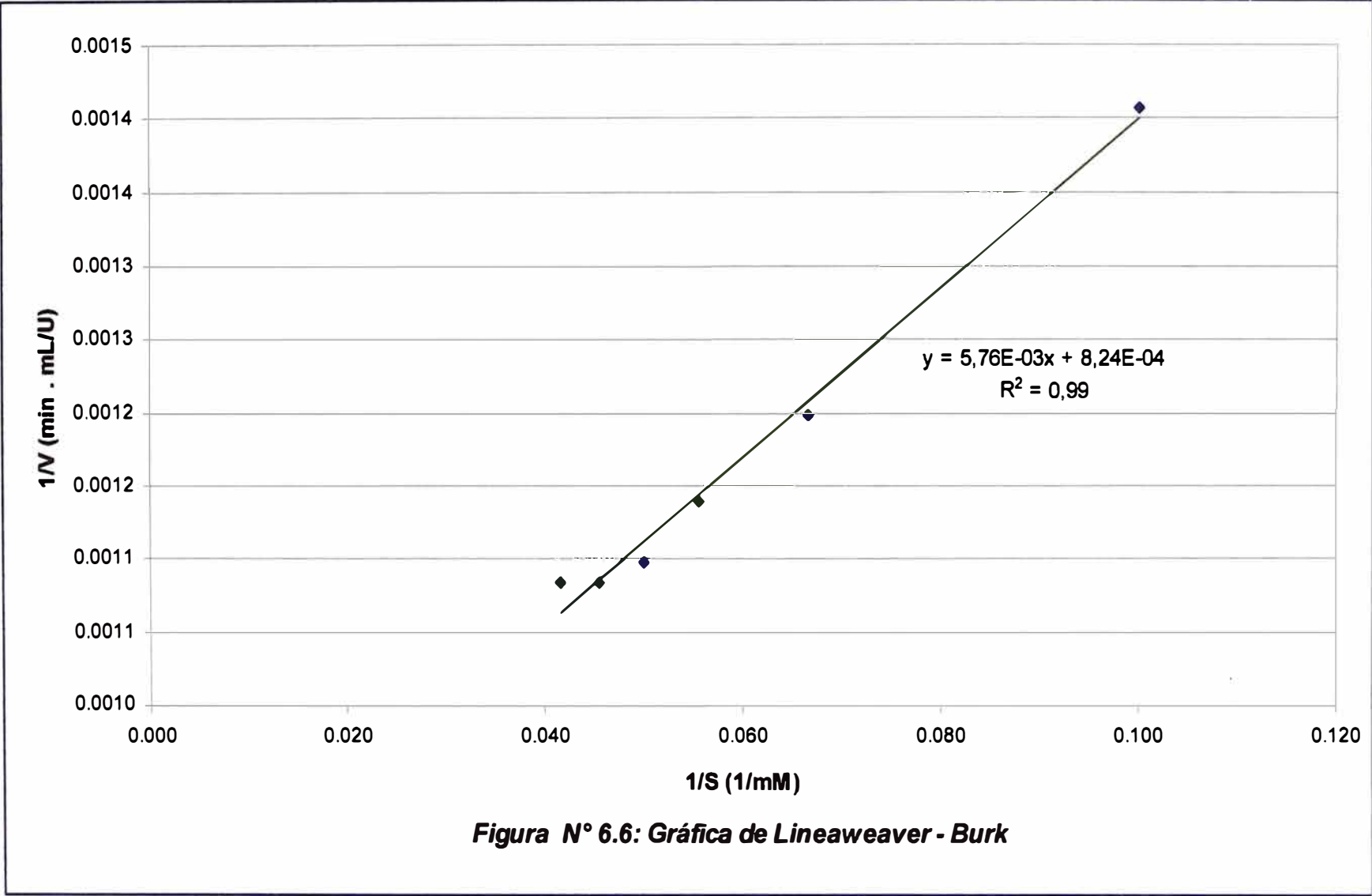


Figura N° 6.6: Gráfica de Lineaweaver - Burk

6.6. VELOCIDAD MÁXIMA DE REACCIÓN

La velocidad máxima de reacción es un valor límite que se alcanza cuando todos sitios activos de la enzima están ocupados por el sustrato (saturación), debido a que este último, se encuentra en altas concentraciones.

El efecto de la concentración del sustrato en la velocidad se evalúa manteniendo constante las condiciones de reacción (pH, temperatura, concentración de enzima).

La velocidad máxima ($V_{\text{máx}}$) se determina según la ecuación de Michaelis Menten y Lineweaver - Burk (a partir de las figuras N° 6.5 y N° 6.6); obteniéndose que la velocidad de reacción es igual a 921,9 U/mL.min y 1 213,6 U/mL.min respectivamente.

VII. APLICACIÓN DE LA PEROXIDASA

La POD tiene aplicación en la determinación de análisis clínicos tales como: *glucosa, colesterol, triglicéridos y ácido úrico (Ver ítem 4.4)*; por tanto el presente trabajo utiliza la enzima POD, obtenida a partir del proceso de extracción, en la formulación de un reactivo para determinación de glucosa.

7.1. FORMULACIÓN DEL REACTIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA

La formulación del reactivo es planteada de acuerdo a referencias bibliográficas que se basan en el método enzimático para la determinación de glucosa y proponen la utilización de dos enzimas, *glucosa oxidasa (GOD, obtenida de Aspergillus Níger)* y *peroxidasa (POD, obtenida del rábano picante - Armoracia Lapothifolia)*; fenol, 4-aminofenazona y buffer fosfato 0,2 M (pH = 7), para llevar a cabo la reacción de secuencia por acoplamiento empleando un monorreactivo.

Luego, las concentraciones de los compuestos utilizados en el reactivo son establecidas de referencias bibliográficas. Sin embargo, se modifica y evalúa la concentración de enzima POD empleando la extraída de la alcachofa (*Cynara Scolymus*).

El reactivo es formulado considerando que el valor de transmitancia obtenido para una concentración estándar de 100 mg/dL sea igual a 50. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla N° 7.1.

Tabla N° 7.1: Transmitancia de la muestra estándar según la concentración de POD (Cynara Scolymus) en el reactivo

[POD] (U/mL) Prueba	Transmitancia		
	0,6	1,2	2,4
1	53,5	51,0	50,0
2	53,5	51,0	50,5
3	53,0	50,5	51,0
4	54,0	51,0	50,5
5	53,5	51,0	50,5
Promedio	53,5	50,9	50,5

Los resultados de la tabla N° 7.1 muestran que utilizándose una concentración de POD igual a 2,4 U/mL en el reactivo se obtiene un valor de transmitancia (T) promedio igual a 50,5 para el estándar, próximo al valor recomendable (T = 50) en comparación a los obtenidos con concentraciones de 0,6 y 1,2 U/mL (transmitancias de 53,5 y 50,9 ($\cong 51,0$) respectivamente). Sin embargo, al no haber una variación apreciable en los valores de transmitancia utilizando concentraciones de 1,2 y 2,4 U/mL, se decide emplear la menor concentración de POD, para este caso igual a 1,2 U/mL que es favorable desde el punto de vista económico y técnico.

La tabla N° 7.2 muestra las concentraciones utilizadas de cada uno de los compuestos para obtener un factor promedio de 341,96 mg/dL, correspondiente a un valor de transmitancia promedio igual a 51. Como se vio anteriormente (*ítem 4.4.1.2*), dicho factor es tomado en cuenta para la determinación de la concentración de glucosa en una muestra problema según la ec. 11.

Tabla N° 7.2: Formulación inicial del reactivo

Compuesto	Concentración
POD	1,2 U/mL
GOD	11 U/mL
4 -aminofenazona	1,1 mM
Fenol	14 mM

7.2. ESTABILIDAD DEL REACTIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA

Un reactivo es estable cuando no experimenta cambio apreciable en el tiempo de sus características iniciales, es decir, cuando no sufre degradación ni oxidación, que se manifiesten en una disminución de la actividad de las enzimas presentes y una variación del color respectivamente.

Se considera que un reactivo es estable durante 6 meses si el porcentaje de variación entre los resultados de transmitancia obtenidos (para una misma muestra), en condiciones variables de temperatura (12 horas a $T_{amb.} = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 12 horas a $T_{ref.} = 2 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$) para un tiempo de 24 horas, es menor al 5%.

La estabilidad del reactivo (*formulado en el ítem 7.1*) se evalúa teniendo en cuenta los cambios en la oxidación que éste experimenta, así como; la reproducibilidad de los resultados en concentración de glucosa para muestras de suero.

Luego, los cambios en la oxidación del reactivo son seguidos calibrando el equipo con agua destilada y realizando la lectura de

transmitancia del blanco de reactivo (B) a intervalos de 12 horas. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla N° 7.3.

Tabla N° 7.3: Evaluación de la estabilidad del reactivo según la oxidación

Horas Prueba	Transmitancia para el blanco de reactivo (B)			
	0	12	24	36
1	97,5	88,0	81,5	76,5
2	97,0	88,5	81,0	77,0
3	97,5	88,5	82,0	76,5
4	97,0	88,0	82,0	76,5
Promedio	97,2	88,2	81,6	76,6
% variación	—	9,3	16,1	21,2

% variación respecto al promedio obtenido en el tiempo inicial (0 horas)

Los resultados de transmitancia para el blanco de reactivo (B) disminuyen en el tiempo, desde un valor de 97,2 hasta 76,6 en un periodo de tiempo de 36 horas; debido a la oxidación que experimentan los compuestos y azúcares (propios de la alcachofa) presentes en éste, variando su color inicial desde rosado pálido a intenso. Por otro lado, el aumento del % de variación (9,3%; 16,1% y 21,2%) superior al 5% indica la disminución en la estabilidad del reactivo.

Por otro lado, la estabilidad del reactivo según la reproducibilidad de los resultados en concentración de glucosa fue evaluada utilizando sueros de pacientes normales (problema), los cuales son conservados a temperatura entre 2 y 8 °C y preservados con fluoruro de sodio. Las concentraciones (calculadas según el ítem 4.4.1.2) se muestran a continuación:

Tabla N° 7.4: Evaluación de la estabilidad del reactivo según las concentraciones de glucosa en suero

Suero \ Horas	Concentración de glucosa (mg/dL)				% variación
	0	12	24	36	
1	80,5	77,5	75,0	74,3	6,8
2	97,0	93,5	91,0	90,5	6,2
3	75,5	72,5	70,5	69,5	6,6
4	100,5	96,6	94,2	93,1	6,3
5	87,0	83,5	81,2	80,0	6,7
Promedio					6,5

% variación para el tiempo 24 horas respecto al inicial (t = 0 horas)

Los resultados de concentración en los sueros evaluados disminuyen en el tiempo, obteniéndose un porcentaje de variación promedio de 6,5 (mayor al 5%) en las concentraciones respecto al tiempo inicial, indicando que el reactivo pierde estabilidad (se degrada) en un tiempo menor a 24 horas.

De lo anterior, el reactivo formulado (Ver Tabla N° 7.2) sería estable durante 3 meses debido a la ausencia de preservantes y estabilizantes en su composición. Por lo tanto, el reactivo es modificado mediante la adición de compuestos que retarden la oxidación del mismo.

El cambio de color debido a la oxidación en el reactivo modificado es seguido con los valores de transmitancia para el blanco de reactivo, calibrando el equipo con agua destilada.

Tabla N° 7.5: Estabilizantes utilizados en el reactivo formulado

Tiempo (h) Estabilizante	Transmitancia					% variación
	0	12	24	36	48	
Brij 35	96,5	93,5	90,5	88,0	86,5	10,4
Tritón 100	97,0	96,0	95,5	95,0	94,5	2,5
Sodio lauril sulfato	96,5	93,0	89,5	85,0	84,5	12,5
Poli oxietileno sorbitan mono laurato	97,5	96,5	94,0	94,5	93,5	4,1
Poli oxietileno (20) sorbitan mono laurato	97,0	95,5	94,0	93,5	92,5	4,6

% variación para el tiempo 48 horas respecto al inicial (t = 0 horas)

Los resultados obtenidos en la tabla N° 7.5 muestran que el porcentaje de variación de transmitancia para el blanco de reactivo (B) es de 2,5% (menor al 5%), al incluirse el compuesto Tritón 100 en la composición del reactivo, ya que retarda la oxidación del mismo. Por lo tanto, el reactivo sería estable durante un año en condiciones de refrigeración entre 2 y 8 °C.

Adicionalmente el reactivo es provisto de compuestos preservantes (según referencias bibliográficas) para evitar una posible contaminación bacteriana y mantener la actividad de sus compuestos. Las lecturas de transmitancia corresponden al estándar (E). Los resultados se muestran en la tabla N° 7.6.

Tabla N° 7.6: Compuestos preservantes utilizados en el reactivo

Tiempo (h) Preservante	Transmitancia del estándar			Promedio
	0	24	48	
m- peryodato de sodio	52,5	52,0	52,0	52,2
Sulfato de neomicina	51,5	51,5	51,5	51,5
Etil mercurio tiosalicilato	51,0	51,0	51,0	51,0

La Tabla N° 7.6 muestra que el empleo Etil mercurio tiosalicilato permite preservar mejor al reactivo, reproduciendo el valor de transmitancia inicial para el estándar ($T = 51$, Factor = 341,96 mg/dL).

Finalmente, en la tabla N° 7.7 se muestra la composición del reactivo formulado:

Tabla N° 7.7: Formulación final del reactivo

Compuesto	Concentración
POD	1,2 U/mL
GOD	11 U/mL
4 -aminofenazona	1,1 mM
Fenol	14 mM
Tritón 100	0,1% (v/v)
Etil mercurio tiosalicilato	0,1% (w/v)

7.3. LINEALIDAD DEL REACTIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA

La linealidad del reactivo permite conocer la máxima concentración de glucosa que puede ser medida directamente en una muestra de suero, empleando el reactivo formulado. Para ello, se varia el volumen (μL)

de la muestra estándar (concentración conocida: 100 mg/dL), de acuerdo al procedimiento siguiente:

Tabla N° 7.8: Linealidad del reactivo formulado

Tubo	1	2	3	4	5	6	7
Muestra estándar (µL)	5	10	20	30	40	50	60
Reactivo (mL)	1,05	1,00	0,99	0,98	0,97	0,96	0,95

La lectura se realiza a los 10 min después de homogenizar e incubar la muestra a 37°C.

La figura N° 7.1 muestra la relación entre los valores de absorbancia y la concentración de glucosa (mg/dL) en una muestra estándar, observándose que el reactivo presenta una linealidad en concentraciones de glucosa hasta un valor de 400 mg/dL (Concentración proporcional a 40 µL de muestra estándar).

7.4. VALIDACIÓN DEL REACTIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA

La validación del reactivo se lleva a cabo con la medición de los niveles de glucosa presentes en sueros controles usados por los diversos laboratorios, en este caso se utilizan los sueros para control normal y patológico, "Humatrol N" y "Humatrol P" respectivamente. Adicionalmente se realiza mediciones de niveles de glucosa en muestras de suero de pacientes normales y patológicos.

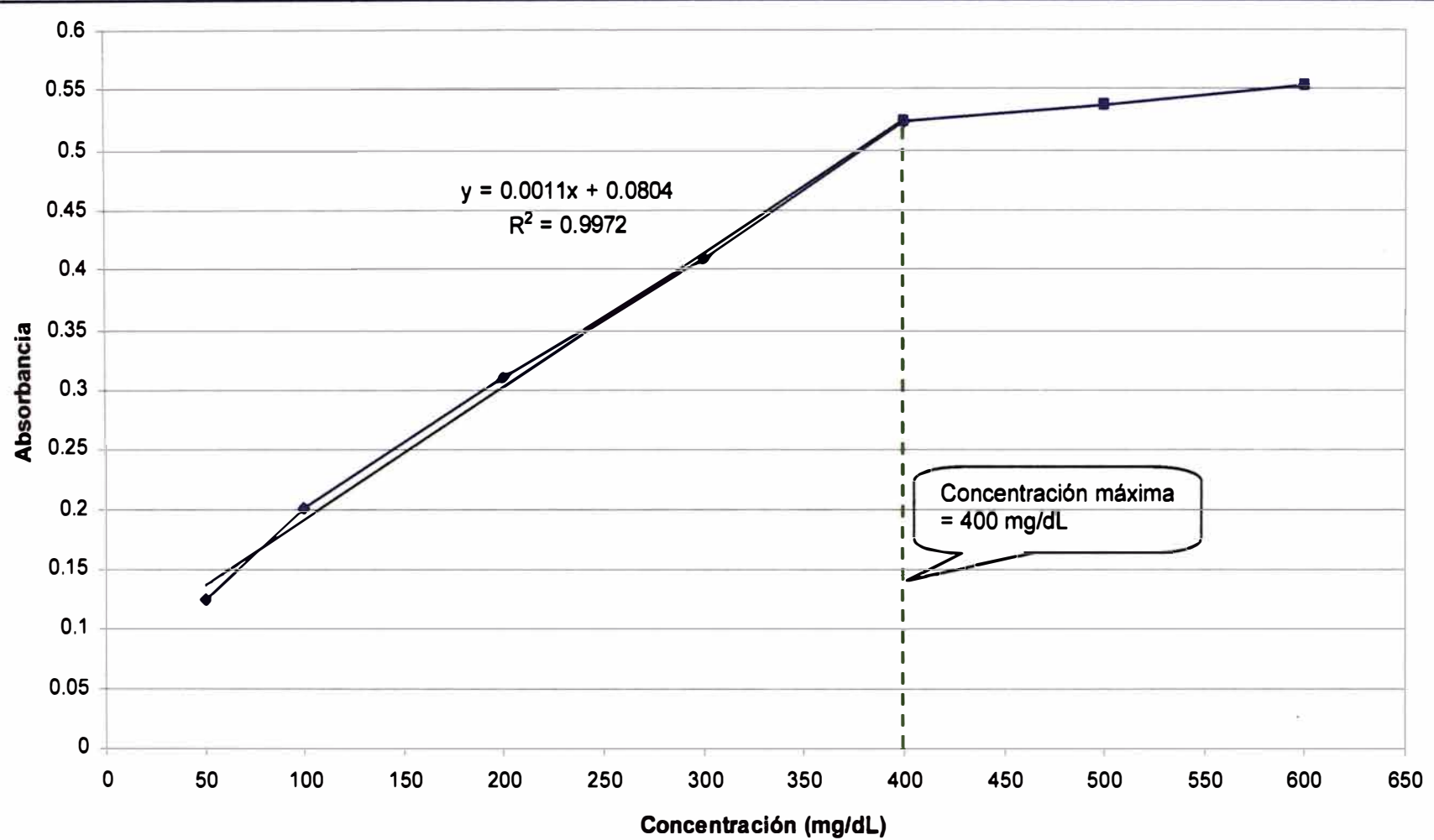


Figura N° 7.1: Linealidad en la medición de glucosa

La determinación de las concentraciones de glucosa en las muestras controles (Humatrol "N" y "P") y problemas (pacientes) se realiza siguiendo la técnica descrita en el *ítem 4.4.1.2* y aplicando la ec. N° 11 (factor = 341,96 mg/dL, *ítem 7.1*).

Los resultados de las concentraciones de glucosa para ambos controles son los siguientes:

Control normal "Humatrol N"

Niveles de referencia:

Valor promedio = 123,0 mg/dL

Máximo rango permitido: 105,0 – 141,5 mg/dL

Tabla N° 7.9: Control normal para el reactivo formulado

Prueba	Concentración de glucosa (mg/dL)
1	125,5
2	122,4
3	125,5
Promedio	124,5

Control patológico "Humatrol P"

Niveles de referencia:

Valor promedio = 250,7 mg/dL

Máximo rango permitido: 213,1 – 288,3 mg/dL

Tabla N° 7.10: Control patológico para el reactivo formulado

Prueba	Concentración de glucosa (mg/dL)
1	254,1
2	252,9
3	253,0
Promedio	253,3

Las tablas N° 7.9 y 7.10 muestra que los resultados para ambos controles Humatrol N y Humatrol P se encuentran dentro de los rangos permitidos (límites de confianza) con valores promedio de 124,5 mg/dL y 253,3 mg/dL respectivamente, próximos al promedio de referencia. Por lo tanto, el reactivo puede ser utilizado satisfactoriamente en la cuantificación de niveles normales y patológicos de glucosa en una muestra de concentración desconocida.

Adicionalmente, el reactivo se valida, comparando los resultados de concentración de glucosa empleando el reactivo formulado frente a los obtenidos con el reactivo del **Laboratorio Ingeniería Médica E.I.R.L (IM.LAB)** para 10 muestras fisiológicas (5 muestras en valores normales y 5 patológicas). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla N° 7.11.

Tabla N° 7.11: Validación del reactivo formulado

Muestra	Resultados obtenidos (mg/dL)	Resultados reportados (mg/dL)	% variación
P1	81,7	80,4	1,6
P2	114,8	116,3	1,3
P3	92,0	90,9	1,2
P4	91,1	89,6	1,7
P5	127,2	125,5	1,4
P6	98,9	100,2	1,3
P7	76,2	75,1	1,5
P8	88,9	87,5	1,6
P9	120,9	119,0	1,6
P10	59,8	60,6	1,3

Pi: muestra problema, i = 1, 2, 3, ..., 8, 9, 10

Los resultados de la tabla N° 7.11 muestran que el reactivo formulado permite determinar concentraciones de glucosa próximos a los obtenidos con el reactivo IM.LAB, con un porcentaje de variación no mayor al 2% en todos los casos; proporcionando de esta manera datos confiables en la evaluación de muestras fisiológicas.

VIII. ESQUEMA DE PLANTA PILOTO

La planta piloto se diseña en base al estudio realizado para la extracción de la enzima peroxidasa a nivel laboratorio. La cantidad de materia prima a procesar es de 1 000 kg de alcachofa, obteniéndose 1,3 kg de enzima para su aplicación en la elaboración de reactivos de diagnóstico clínico.

La planta opera durante 3 turnos por día (c/turno de 8 horas), procesándose el primer lote de alcachofa (1 000 kg) en un tiempo de 19 horas; asimismo, con la finalidad de aprovechar la disponibilidad de la planta se considera iniciar un segundo lote, transcurrido 13 horas de haberse iniciado el proceso de extracción.

Para llevar a cabo el proceso de extracción, las etapas correspondientes a la selección y el lavado (Ver Cáp. V) se realizan como sigue:

La selección de las alcachofas, abastecidas desde las zonas de origen y refrigeradas entre 2 y 8 °C, se realiza sobre mesas de acero inoxidable; en forma visual, separando por corte manual aquellas partes que no se encuentren aptas.

La etapa de lavado se realiza en recipientes de acero inoxidable que contienen solución clorada de 10 ppm. El tiempo de contacto es de 20 min aproximadamente y luego las alcachofas son retiradas hacia otros recipientes de concentración igual a 1 ppm para su enjuague final.

El tiempo disponible para ambas etapas (selección y lavado) es de 1 h.

8.1. BALANCE DE MATERIA Y ENERGIA

El balance de materia se estima a partir del obtenido a nivel de laboratorio y es utilizado en la selección y/o cálculos del diseño de los equipos requeridos para las etapas siguientes al lavado. Se considera para el balance de materia 1 000 kg de alcachofa como base, cantidad que puede ser abastecida a la planta piloto, según la Producción Nacional de Alcachofa (Ver anexo).

La figura N° 8.1 muestra las corrientes de entrada y salida en cada etapa del proceso (materia prima, insumos, producto y subproducto), que se tiene en cuenta para la selección y/o diseño de los equipos.

El requerimiento energético proporciona a los tanques (extractor y mezcladores) las condiciones de enfriamiento para llevar a cabo el proceso de extracción entre 2 - 8 °C.

Se considera que la alimentación ingresa al tanque extractor a temperatura ambiente; la disminución de la temperatura se consigue por medio de la circulación de un refrigerante (salmuera), siendo el calor transferido igual a 85 050 kcal. Por otro lado se asume que la corriente proveniente del tanque extractor ingresa a los mezcladores a una temperatura de 8 °C. La tabla N° 8.1 muestra el calor requerido para mantener el sistema refrigerado.

Tabla N° 8.1: Requerimiento de calor en los tanques mezcladores

Tanque mezclador	Calor requerido (kcal)
M-200	16 200
M-300	23 260
M-400	19 984
M-500	29 912

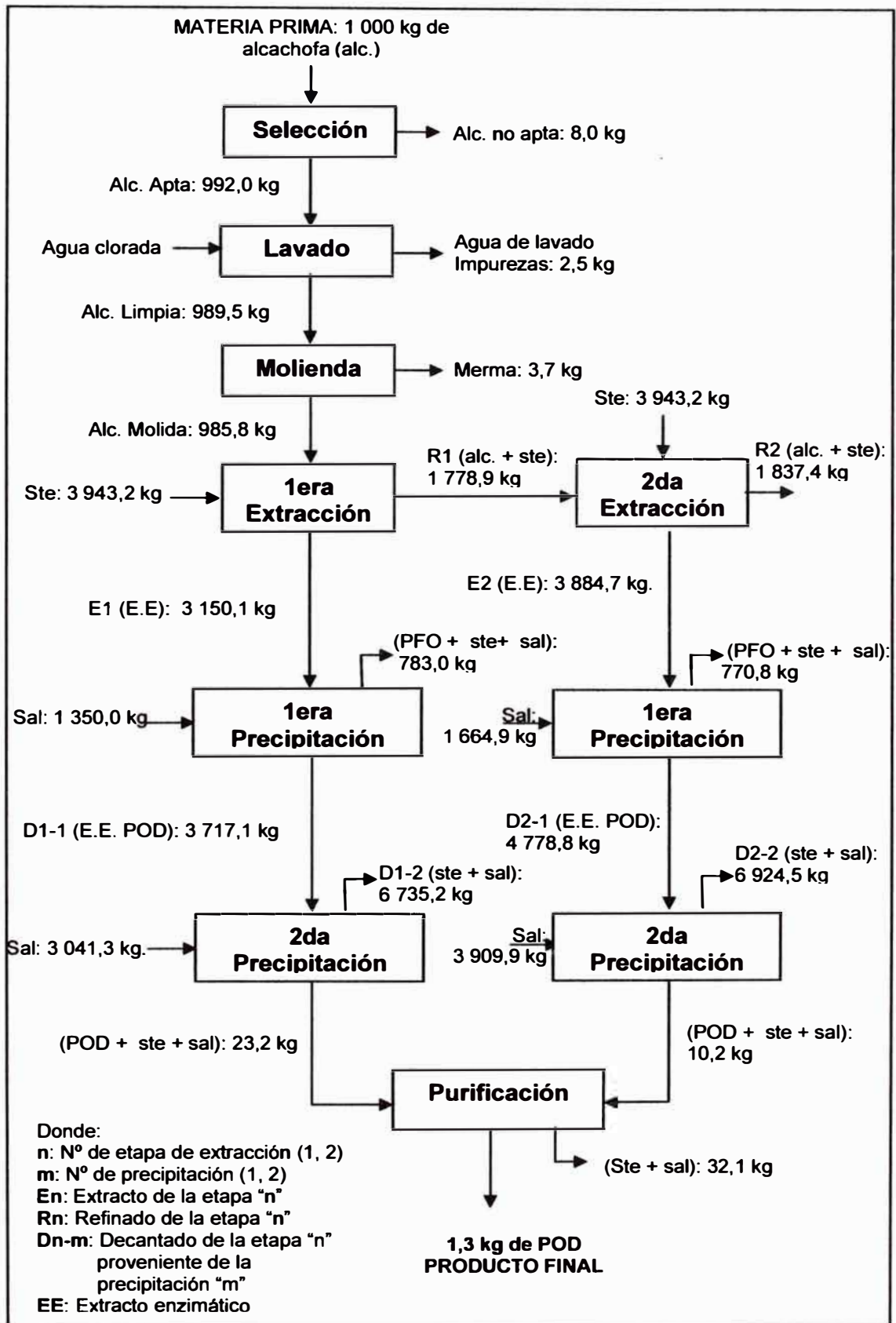


Figura N° 8.1: Balance de materia para una planta piloto

8.2. SELECCIÓN Y/O DISEÑO DE EQUIPOS

La selección y/o diseño de los equipos se basa en los requerimientos de proceso y el balance de materia. La Tabla N° 8.2 muestra la codificación utilizada para los equipos.

Tabla N° 8.2: Codificación de los equipos

Equipo	Código
Molino	C
Mezcladores	M
Separadores (Centrífuga)	H
Bombas	L
Unidad de refrigeración	A

Los equipos descritos a continuación siguen el orden de las etapas del proceso de extracción posteriores al lavado.

8.2.1. MOLINO DE DISCOS (C - 100)

El equipo utilizado en la reducción de tamaño de la alcachofa (materia prima) es un molino de un disco móvil, cuya cara plana estriada gira a gran velocidad para generar fuerzas de cizalla intensas, que permitan la molturación de partículas medias a partir de una alimentación de materiales fibrosos, húmedos y/o semisecos.

El molino utiliza una tolva para la alimentación, la cual ingresa a través de una abertura situada en el centro de la carcasa fija y luego al espacio comprendido entre éste y el disco móvil, descargando finalmente por la periferia en una carcasa

estacionaria. La separación de los discos es ajustable lo que permite obtener tamaños de partículas deseados.

El material del equipo es acero inoxidable 302 para evitar la corrosión del mismo debido al elevado porcentaje de agua (85,5%) presente en la materia prima.

Tabla N° 8.3: Especificaciones técnicas del Molino de discos

Características	Especificaciones
Capacidad	1 t/h
Tamaño de partícula	4 mm (malla 5)
Potencia	4,5 kW (6 HP)
Material	Acero inoxidable 302
Otros	Fácil carga y descarga

8.2.2. TANQUE EXTRACTOR (M -100)

La extracción sólido - líquido se realiza con agitación en un tanque tipo cilíndrico provisto de un impulsor de flujo axial tipo hélice, para mantener las partículas sólidas en suspensión y favorecer la extracción de proteínas presentes en el material sólido.

El equipo propuesto incluye en su diseño 4 filtros laterales y verticales de malla 8, cuya finalidad es retener el material sólido (refinado) para la segunda etapa de extracción y permitir que el extracto enzimático pase a través del mismo; para ser enviado hacia un segundo tanque, en donde se realiza la precipitación de la enzima de polifeniloxidasas. Asimismo, los filtros evitan la turbulencia (formación de vórtices) ya que actúan como deflectores.

La extracción debe realizarse en un rango de temperatura entre 2 y 8 °C para conservar las enzimas, razón por la cual se debe incluir en el diseño una chaqueta de enfriamiento que emplea como liquido refrigerante, una solución de salmuera.

Tabla N° 8.4: Especificaciones técnicas del Tanque extractor

Características	Especificaciones
Tanque extractor	
Capacidad	6,1 m ³
Altura (H)	2,4 m
Diámetro (D)	1,8 m
Material	Acero inoxidable
Impulsor	
Tipo	Hélice
Cantidad	1
Velocidad	400 rpm
Diámetro (Di)	0,45 m
Altura de colocación (Ha)	0,60 m
Potencia	3,0 kW (4 HP)
Filtros y/o deflectores	
Cantidad	4
Ancho (J)	0,20 m

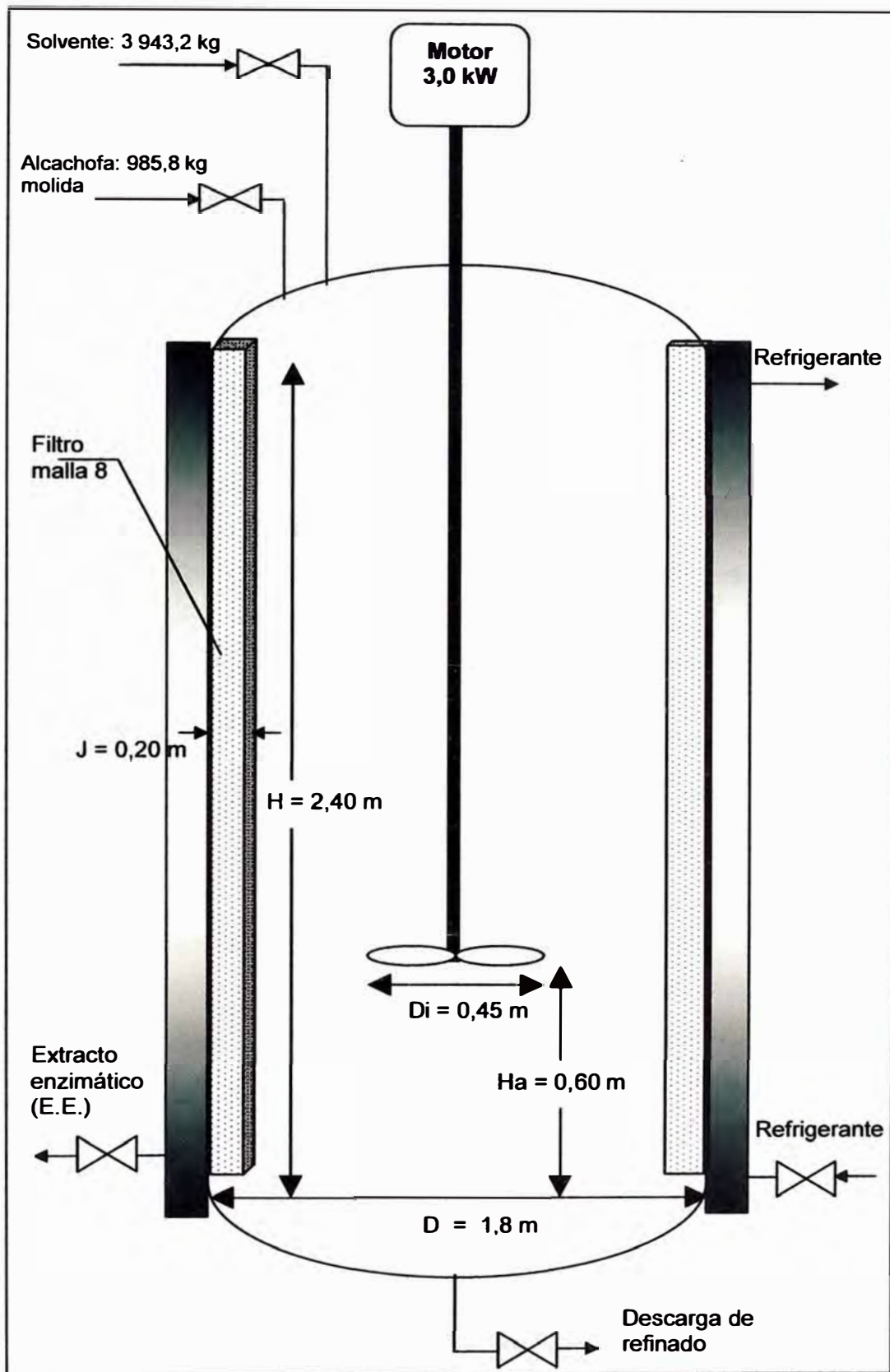


Figura N° 8.2: Diseño del tanque extractor (M - 100)

8.2.3. TANQUES MEZCLADORES (M - 200: M - 500)

Los tanques de tipo cilíndrico son utilizados en las etapas de precipitación, éstos incluyen en su diseño un agitador de flujo axial uniforme (turbinas); de palas inclinadas en un ángulo de 45°, girando a una velocidad de 150 rpm.

Los tanques están provistos con deflectores para mejorar el mezclado y evitar la formación de vórtices. Así también, están recubiertos con una chaqueta de enfriamiento que permite mantener el sistema entre 2 y 8 °C.

Las precipitaciones de polifeniloxidasa y peroxidasa se realizan independientemente; por tanto, se considerará el diseño de 4 tanques, los cuales serán utilizados en la primera y segunda etapa de extracción (2 tanques por cada etapa).

Las especificaciones técnicas de los tanques mezcladores se presentan en la Tabla N° 8.5.

8.2.4. CENTRIFUGAS (H - 100 : H - 1300)

La separación de las enzimas polifeniloxidasa y peroxidasa (obtenidas por precipitación) se realiza mediante centrifugación, esta operación permite recuperar la mayor parte de las enzimas como precipitado, reduciendo además el tiempo de separación en comparación al requerido en una sedimentación natural.

La selección de equipos considera el empleo de ultracentrífugas (centrífugas de elevada velocidad) para conseguir en una primera etapa, eliminar la mayor parte de la enzima PFO (interferente en la

Tabla N° 8.5: Especificaciones técnicas de los tanques mezcladores

	Primera etapa de extracción		Segunda etapa de extracción	
Tanque mezclador	M – 200	M – 300	M - 400	M – 500
Tipo	Cilíndrico	Cilíndrico	Cilíndrico	Cilíndrico
Capacidad	5,0 m ³	7,0 m ³	6,1 m ³	9,7 m ³
Altura	2,2 m	2,5 m	2,4 m	2,8 m
Diámetro	1,7 m	1,9 m	1,8 m	2,1 m
Material	Acero inoxidable	Acero inoxidable	Acero inoxidable	Acero inoxidable
Impulsor				
Tipo	Turbinas de 4 palas	Turbinas de 4 palas	Turbinas de 4 palas	Turbinas de 4 palas
Cantidad	1	1	1	1
Velocidad	150 rpm	150 rpm	150 rpm	150 rpm
Diámetro	0,7 m	0,8 m	0,7 m	0,8 m
Altura de colocación	0,6 m	0,6 m	0,6 m	0,7 m
Potencia	0,8 kW (1,1 HP)	1,1 kW (1,6 HP)	1,0 kW (1,3 HP)	0,9 kW (2 HP)
Deflectores				
Cantidad	2	4	2	4
Ancho	0,16 m	0,16 m	0,15 m	0,18 m

posterior aplicación de la POD) y en una segunda etapa recuperar la mayor cantidad de enzima POD en el precipitado.

Las centrifugas constan de un recipiente cilíndrico de acero inoxidable que contiene en su interior un compartimiento tubular central, por el cual ingresa la alimentación (suspensión sólido-líquido). La velocidad de centrifugación igual a 35 000 rpm permite la separación de las partículas sólidas (precipitado) hacia las paredes del recipiente. El sobrenadante es separado por rebose para la posterior precipitación y separación de la POD. Los precipitados son retirados del equipo por solubilización con agua de lavado.

Las centrifugas se encuentran provistas de un sistema de refrigeración para la conservación de la enzima.

Tabla N° 8.6: Especificaciones técnicas de las centrifugas

Características	Especificaciones
Capacidad	150 L/h
Velocidad	35 000 rpm
Temperatura	2 - 8 °C
Potencia	1,5 kW (2 HP)
Cantidad	13
Material	Acero inoxidable

8.2.5. BOMBAS CENTRIFUGAS (L -100 : L - 800)

Se selecciona bombas centrifugas de tipo radial puesto que los fluidos en el proceso tienen baja viscosidad. La tabla N° 8.7 muestra las especificaciones técnicas para cada bomba requerida.

Tabla N° 8.7: Especificaciones técnicas de las bombas centrífugas

Bomba		L100	L200	L300	L400	L500	L600	L700	L800
Especific.									
Material		Fierro fundido con revestimiento de acero inoxidable							
Caudal (m ³ /h)		30,0	0,9	1,1	0,9	0,9	1,1	0,9	45,0
Altura manométrica (mH ₂ O)		2,4	1,5	2,5	1,5	1,5	2,8	1,5	2,8
Potencia	kW	4,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	5,2
	(HP)	6,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	7,0

8.3. DIAGRAMA DE FLUJO

El diagrama de flujo para el proceso de extracción de la enzima peroxidasa en una planta piloto, se adjunta a continuación (Ver Figura N° 8.3).

PLANO 01

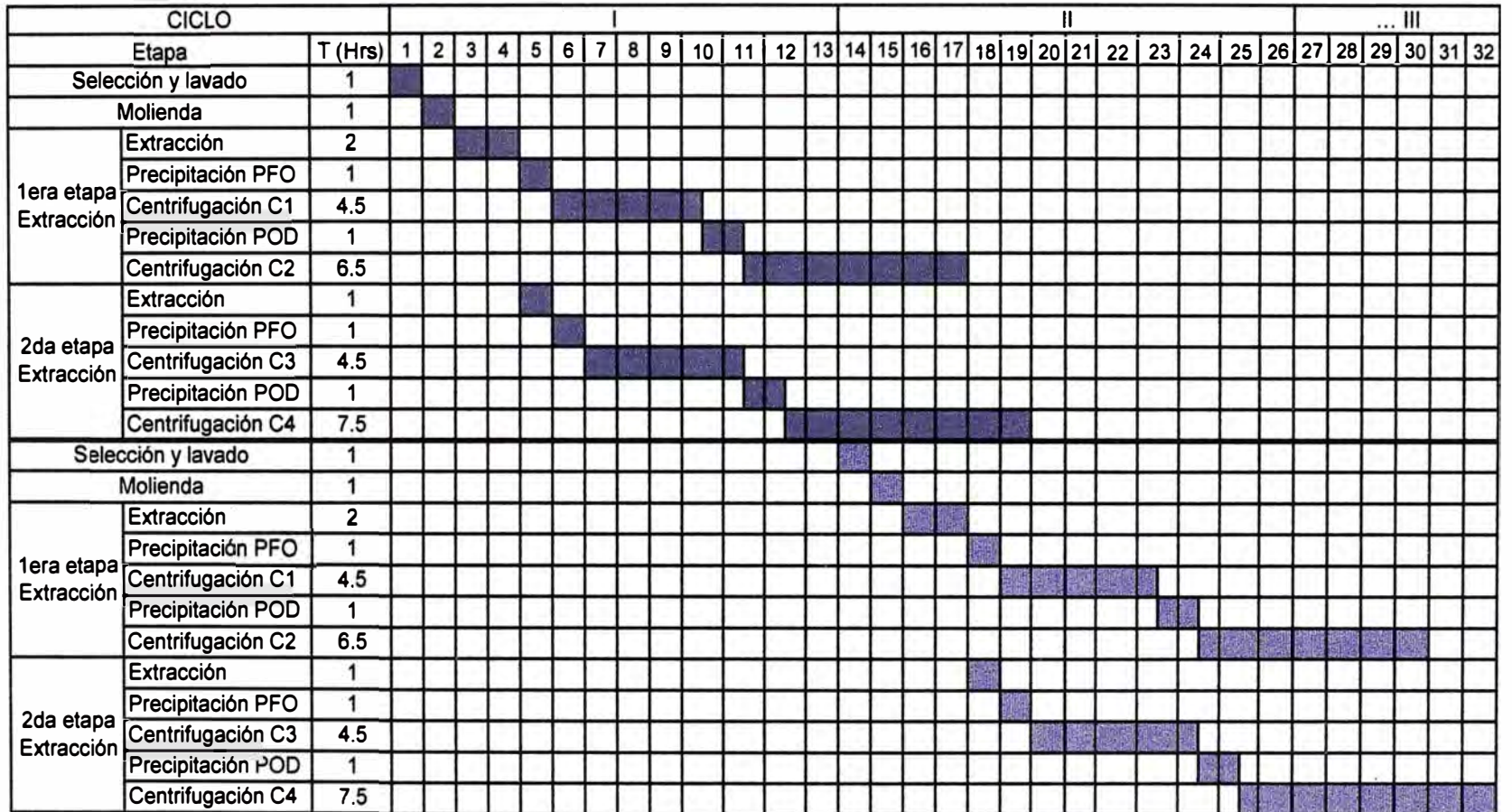
8.4. DIAGRAMA DE GANTT

Las etapas para la extracción de la enzima POD, así como el tiempo que involucra cada una de ellas; se representa mediante el Diagrama de Gantt. Éste proporciona el tiempo mínimo requerido para iniciar un segundo ciclo del proceso de extracción, aprovechando la disponibilidad de la planta piloto y reduciendo por tanto los cuellos de botella que pueden generarse.

De la figura N° 8.4 se observa que el tiempo mínimo requerido para iniciar un segundo ciclo del proceso de extracción es después de 13 horas de haberse iniciado el primero, el mismo que se concluye en un tiempo de 19 horas. Por otro lado, se observa que la etapa limitante para iniciar un segundo ciclo del proceso corresponde a la centrifugación debido a que los equipos son utilizados tanto en la separación del precipitado de PFO como de la POD (producto final); siendo ello la razón por la cual no es posible reducir dicho tiempo.

8.5. COSTO DE PROCESAMIENTO

El costo de procesamiento por gramo de POD considera los requerimientos de materia prima, mano de obra, etc. para llevar a cabo el proceso de extracción de 1,3 kg de POD en una planta piloto que operará 6 días por semana contando con 3 turnos diarios. Cada turno requiere de 2 operarios y 1 supervisor. La tabla N° 8.8 muestra el costo de procesamiento por gramo de enzima POD basado en los requerimientos, según datos experimentales de laboratorio.



C1 y C3: Centrifugación para la obtención del extracto de POD libre de PFO.
 C2 y C4: Centrifugación para la obtención de la enzima POD como precipitado.

Figura N° 8.4: Diagrama de Gantt para la extracción de la enzima peroxidasa

Tabla N° 8.8: Costo de procesamiento

		Cantidad requerida	Unidad	Costo unitario (S./)Unid	Subtotal (S./) *
COSTOS DIRECTOS					
Materia prima		1 000,0	kg	1,2	1 200,0
Insumos	Solvente	7 886,4	kg	10,2	80 441,3
	Sal sulfato	9 966,1	kg	56,9	567 071,1
Mano de obra		38,0	h-H	3,1	117,8
COSTOS INDIRECTOS					
Agua		4,0	m ³	4,7	18,8
Energía eléctrica		362,9	kW-h	4,8	1 741,9
Supervisión		19,0	h-H	8,1	153,9
Mantenimiento (5% Costo de proces.)					31 768,8
VENTA DE SUB PRODUCTO					
Refinado		1 837,4	kg	0,02	36,7
Enzima PFO		77,9	kg	49,5	3 856,0
Sal		6 478,0	kg	8,5	55 063,0
COSTO DE PROCESAMIENTO POR LOTE (S./)					635 375,3
COSTO DE PROCESAMIENTO (s/Jg DE ENZIMA POD)					488,7

* Los costos no incluyen el impuesto general a la venta (I.G.V).

De la tabla N° 8.8 se observa que el costo de procesamiento por gramo de enzima peroxidasa es de S/.488.7.

IX. RESULTADOS

9.1. CARACTERÍSTICAS DE LA PEROXIDASA

La POD extraída a partir de la alcachofa (*Cynara Scolymus*) mediante concentración por precipitación con Sulfato de Amonio presenta las siguientes características en solución:

Tabla N° 9.1: Caracterización de la enzima Peroxidasa

Características	Observaciones
Fuente	Alcachofa (<i>Cynara Scolymus</i>)
Aspecto	Líquido con turbidez (Transmitancia igual a 88, medida a $\lambda = 470$ nm, empleando agua destilada como blanco)
Actividad relativa	28 U/mL, medida con H ₂ O ₂ 4,4 mM y 2-metoxi fenol 20 mM (pH = 6,0 T = 25 °C)
Solubilidad (T _{amb})	Altamente soluble en agua
Linealidad	Hasta 425 mg/dL (r = 0.99)
Temperatura de reacción	40 °C
Temperatura de almacenamiento	2 - 8 °C
pH de reacción	6,0
Uso	Elaboración de un reactivo de diagnóstico para determinar glucosa en suero.

9.2. EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO

El rendimiento fue calculado teniendo en cuenta la cantidad de enzima POD obtenida a partir de una base de 100 g de alcachofa, tal como se indicó en el balance de materia (*ítem 5.3*), aplicando la siguiente expresión:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Cantidad obtenida de POD (g)} \cdot 100}{\text{Cantidad de materia prima (g)}}$$

Al reemplazar los datos, se tiene que el valor de rendimiento es igual al 0,13%, comparativamente mayor a los valores obtenidos según las referencias bibliográficas.

X. CONCLUSIONES

1. Se comprueba que la alcachofa es una fuente alternativa y viable para la obtención de una enzima peroxidasa con actividad relativa de 28 U/mL.
2. El tamaño de partícula requerido para la extracción es de 4 mm, lo cual se consigue con un molino de disco.
3. El solvente utilizado es un buffer acetato cuya composición y pH = 4.5 permite obtener una enzima de actividad 28 U/mL, mayor a los otros solventes utilizados.
4. La concentración de soluto empleado es del 25% en peso.
5. El proceso de extracción se lleva a cabo en 2 etapas; en intervalos de tiempo de 2 h y 1 h respectivamente.
6. Las concentraciones de sulfato de amonio empleadas para precipitación la polifeniloxidasas (PFO) y peroxidasa (POD) son de 30% y 75% respectivamente.
7. Las extracciones se realizan en condiciones de refrigeración a temperaturas entre 2 y 8 °C para una mejor conservación de la enzima.
8. El rendimiento obtenido en el proceso de extracción de la enzima POD es de 0,13%.
9. El pH óptimo para la reacción de la enzima POD es de 6,0.

10. La temperatura óptima para la reacción de la enzima POD es de 40 °C.
11. La enzima peroxidasa obtenida puede utilizarse en la elaboración de reactivos de diagnóstico clínico.
12. El reactivo elaborado para la determinación de glucosa permite reproducir valores confiables en muestras de pacientes con niveles normales y patológicos de glucosa.
13. El reactivo para determinación de glucosa se comporta linealmente hasta una concentración no mayor a 400 mg/dL y es estable durante un periodo de tiempo de un año en condiciones de refrigeración (2 y 8 °C).
14. El costo de procesamiento por gramo de enzima peroxidasa es de 488,7 soles.

XI. RECOMENDACIONES

1. Desarrollar nuevos reactivos de diagnóstico clínico para la determinación de colesterol, triglicéridos o ácido úrico, incluyendo en su composición la enzima peroxidasa extraída a partir de la alcachofa (*Cynara Scolymus*).
2. Realizar el tratamiento y purificación de la enzima polifeniloxidasasa (PFO) obtenida como subproducto del proceso de extracción, ya que tiene aplicación en la síntesis de la lignina, oxidación del ácido indol acético (AIA) y además, en aspectos fitopatológicos relacionados con resistencia a enfermedades.
3. Realizar el estudio de Pre-factibilidad para la producción de la enzima peroxidasa (POD) a nivel industrial dado que actualmente nuestro país no cuenta con ninguna empresa productora de ésta enzima.
4. Acondicionar el refinado obtenido (residuo sólido) mediante lavado con agua para obtener un material rico en fibra adecuado para la fabricación de piensos, como fuente para la obtención de otros bioproductos con aplicaciones sanitarias, agroalimentarias o industriales.
5. Aprovechar el solvente utilizado en el proceso de extracción mediante la recuperación de la sal sulfato de amonio para procesos que no requieran una sal de alta pureza.
6. Realizar el proceso de extracción a nivel de laboratorio en condiciones de refrigeración con la finalidad de preservar la actividad de la enzima.

XII.BIBLIOGRÁFÍA

1. Duarte V., García B., Regalado C., Whitaker J.R., Purification and properties of neutral peroxidase isoenzyme from turnip (*Brassica napus L. top white globe*) roots, Journal of agriculture and food chemistry, México, 2001, p. 49.
2. Tijssen P., Practice and theory of enzyme immunoassays, Elsevier press, London, 1985, p.74
3. García R., Horticultura, 4ta. Edición, Salvat Editores, España, 1952, p. 7.
4. Davelois J., Oliveros V., Najar F., Pastor P., Propuesta de un plan HACCP y estimación de los costos para la implementación en la línea de corazón de alcachofa congelado de la empresa Frozen vegetables S.A., UNALM, Perú, 2001, p. 50.
5. Robles F., La alcachofa nueva alternativa para la agricultura, Prompex, Perú, 2000, p. 5
6. Cerrón V., respuesta a niveles de abonamiento en el cultivo de alcachofa *Cynara Scolymus L.* en el valle del Mantaro, UNALM, 1997, p. 5.
7. Montes A., Holle M., Descripción de algunos cultivos olerícolas, UNALM, Perú, 1970, p. 27
8. Pihan R., Investigación y progreso agropecuario carillanca, Instituto Agropecuario Año 7, Chile, 1988, p. 12
9. Kasmire R., And sell more California agricultural extensive, Service University of California, California, 1914, p.20
10. Delgado de la Flor, Toledo M., Casas J., Datos básicos de cultivos hortícolas, UNALM, Perú, 1982, p. 6.
11. Monge C., Uso del nabo (*Brassica napus*) en la elaboración de imitación de cereza marrasquino y sustituto de piña de mermelada, UNALM, Lima – Perú, 1988, p. 7.

12. Chávez P., Evaluación de 7 cultivares de alcachofa (*Cynara Scolymus* L.), UNALM, Perú, 2001, p. 7.
13. Falen J., "Manual de prácticas de bioquímica", 2da edición, UNFV, Lima – Perú, 1982, p. 50.
14. Schmidt H., Pennacchioli I., Las enzimas en los alimentos, su importancia en la química y la tecnología de los alimentos, 2da. Edición, Editorial Acribia S.A., España, 1990, p. 13.
15. Gacesa P., Hubble J., Tecnología de las enzimas, 2da. Edición, Editorial Acribia S.A., España, 1990, p. 35.
16. Wiseman A., Manual de Biotecnología de enzimas, 2da. Edición, Editorial Acribia S.A., España, 1991, p. 7.
17. Leninger A., Nelson D., Principios de bioquímica, 2da. Edición, Ediciones Omega S.A., España, 1993, p. 211.
18. Mayer P., Martín D., Rodwell V., Bioquímica de Harper, 9na. Edición, Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V., México D.F., 1984, p. 41.
19. Haurowitz F., Química y función de las proteínas, 1era. Edición, Editorial Omega S.A., España, 1969, p. 7.
20. Reed G., Oxidorreductasas in enzymes in food processing, Academy Press, new Cork, 1975, p. 216.
21. Guerci A., Laboratorio – Método de Análisis clínicos y su interpretación, 3era. Edición, Editorial El Ateneo, 1982, p. 204.
22. Bu Lock J., Kristiansen B., Biotecnología Básica, 2da. Edición, Editorial Acribia S.A., España, 1991, p. 410.
23. Perry J., Manual del Ingeniero Químico Tomo II, 3era. Edición, Editorial Uteha, México, 1966, p. 1785.
24. Vilbrabt D., Chemical engineers plants design, 4ta. Edición, Mc. Graw Hill Company Inc., México, 1963, p. 156.
25. Geankoplis C., Procesos de transporte y operaciones unitarias, 2da. Edición, México, 1995, p. 674.

26. Campos C., Alcachofas (*Cynara Scolymus L.*) encurtidas envasadas en aceite, UNALM, Perú, 1996, p. 35.
27. Zahorí D., The cultivated artichoke (*Cynara Scolymus*) its probable wild ancestros, *Econ. Bot.* 29, México, 1975, p. 233.
28. Skoog D., West D., Análisis instrumental, 2da. Edición, Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V., México, 1984, p. 707.
29. Bailey J., Ollas D., Biochemical Engineering fundamentals, 2da. Edición, Mc. Graw Hill Internacional Edition, New York, 1986, p. 129
30. Mejía C., Regalado c., García B., Purificación de peroxidasa de nabo, Departamento de investigación y post grado en alimentos, Universidad autónoma de Querétaro, México, 2002, p. 32.
31. Avallone C., Cravzov A., Montenegro S., Estudio de la actividad de la peroxidasa, pectinerasa y polifeniloxidasa en extracto enzimático de sandía (*Citrullus vulgares schard*), Laboratorio de Tecnología Industrial III, Facultad de Agroindustrias – UNNE, Argentina, p. 56
32. Salve M., Prieto S., Casas A., laboratorio Clínico – Bioquímica, 2da. Edición, Mc. Graw Hill Interamericana Company Inc., México, 1994, p. 84.
33. Trevan M., Gauldguing K., Stambury P., Biotecnología: Principios biológicos, 2da. Edición, Editorial Acribia S.A., España, 1990, p. 178.
34. Bravo T., Saenz F., Estdio químico – bromatológico de las hojas de *Brassica napus L. var napobrassica* “nabo” y *raphanus sativus L. var parvus* “rabanito”, UNMSM, Perú, 1984, p. 20
35. Anguiano C. y asesores científicos, Diccionario de ciencias médicas, 8va edición, Editorial El Ateneo, Argentina, 1988, p. 494.
36. Ralph L., La planta química, 1era. Edición, Compañía Editorial Continental S.A., México, 1970, p. 154.

37. Lynch M., Rápale S., Mellor L., Spare P., Inwood M., Métodos de laboratorio Tomo 1, 2da. Edición, editorial interamericana S.A. de C.V., México, 1987, p. 426.
38. Hemeda H., Klein B., Effects of naturally occurring antioxidants on peroxidase activity of vegetables extracts, journal of food science, 1990, vol. 55, p. 184.
39. Burnette F. Peroxidasa and its relationship to food flavour and quality: a review, Journal of food science, 1977, Vol 42, p. 1.
40. Peters M., Timmerhaus K., Plant design and economics for chemical engineers, 2da. Edición, Editorial Geminis S.R.L. Argentina, 1978, p. 14.
41. Díaz P., Balance de materia y energía, 3era. Edición, Editorial América, Lima – Perú, 1997, p. 187
42. Treybal R., Operaciones de transferencia de masa, 2da. Edición, Mc. Graw Hill Company Inc., México, 1997, p. 529.
43. Fellows P., Tecnología del procesado de los alimentos: principios y prácticas, 2da. Edición, Editorial Acribia S.A., España, 1991, p. 78.

XIII. ANEXOS

CONCENTRACIÓN POR PRECIPITACIÓN

Con el objeto de lograr la concentración y purificación de algunas proteínas específicas se utiliza el método de salado, ya que las sales neutras ejercen efectos pronunciados sobre la solubilidad de proteínas.

El procedimiento consiste en ajustar el pH de la disolución hasta la reacción isoeléctrica de una proteína en particular, en cuyo punto su solubilidad pasa por un valor mínimo; añadiéndose luego, sulfato amónico o sulfato sódico. (19).

Se considera que las sales $MgCl_2$ y el $(NH_4)_2SO_4$ son más eficaces en la solubilización de proteínas que las de $NaCl$, NH_4Cl y KCl . La capacidad de las sales neutras para influir en la solubilidad, está en función de su fuerza iónica, constituyendo éste una medida tanto de la concentración como del número de cargas eléctricas aportadas por la sal. El efecto de solubilidad por salado se manifiesta por cambios de la tendencia a la ionización de los grupos "R" dissociables. A medida que la fuerza iónica aumenta, la solubilidad disminuye, lográndose que la proteína precipite completamente.

Las proteínas precipitadas por salado conservan su conformación nativa y pueden disolverse de nuevo, sin experimentar desnaturalización.

El fraccionamiento con sulfato amónico es una etapa extremadamente efectiva en la purificación proteica. En principio, el método depende de la capacidad que presentan las concentraciones elevadas de sulfato amónico para captar las moléculas de agua presentes evitando de manera efectiva la solvatación de las proteínas. El pH del medio, la

temperatura y la concentración proteica deben mantenerse con las menores variaciones posibles (15).

INFORMACIÓN AGRÍCOLA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ALCACHOFA - 2004

Cultivos/ Variables	Total Ejecuc. y Perspec	COSECHA											
		Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Set	Oct	Nov	Dic
Sup. Verde (ha)		1,224.15	1,224.65	1,785.25	2,369.35	3,035.66	3,114.66	3,236.66	3,405.66	3,527.16	3,644.16	3,668.16	3,672.16
Siembras (ha)	2,487.91	34.00	21.00	596.60	606.10	690.31	105.00	126.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Sup. Perdida (ha)	716.50	566.00	20.50	36.00	22.00	24.00	16.00	4.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Cosechas (ha)	2,812.81	0.00	0.50	0.00	10.00	4.50	0.00	0.50	0.00	0.00	0.00	80.00	2,717.31
Rendimiento (t/ha)	14.89	0.00	2,194.00	0.00	118.80	206.44	0.00	8,879.20	0.00	0.00	0.00	57.57	0.00
Producción (t)	41,873.90	793.50	1,097.00	1,062.00	0	929.00	521.99	4,439.60	4,733.24	2	8,143.45	0	3,267.90
Precio Chacra (S./kg)	1.18	1.26	1.32	1.24	1.16	1.13	0.85	1.10	1.20	1.13	1.17	1.41	1.19

INFORMACIÓN AGRÍCOLA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ALCACHOFA - 2005

Cultivos/ Variables	Total Ejecuc. y Perspec	COSECHA							
		Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago
Sup. Verde (ha)		1,536.85	1,588.85	2,100.35	2,746.60	3,645.10	4,289.60	4,513.60	4,534.10
Siembras (ha)	3,595.00	25.50	164.00	511.50	668.50	899.50	651.50	230.00	0.00
Sup. Perdida (ha)	2,254.81	2,127.81	112.00	0.00	4.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Cosechas (ha)	21.50	0.00	0.00	3.50	15.00	3.00	0.00	0.00	0.00
Rendimiento (t/ha)	0.00	0.00	0.00	441.75	77.37	390.12	0.00	0.00	0.00
Producción (t)	21,615.74	2,025.00	4,246.25	1,546.14	0	5	869.10	1,971.60	8,626.70
Precio Chacra (S./kg)	1.20	1.22	1.52	1.01	1.21	1.35	1.34	1.34	1.00

http://frenteweb.minag.gob.pe/sisagri/agr_p1000.php

Ministerio de Agricultura: SISAGRI (Sistema Agrícola)