

Evolución de la firmeza y el contenido de sólidos solubles durante la maduración natural y artificial de banano

El conocimiento de las modificaciones que sufre el banano luego de la cosecha es de gran importancia para el

desarrollo de alternativas de transformación industrial, dirigidas ...

(ver pág. 7)

CARACTERIZACION DE LA INTERCONVERSION DE LA SACAROSA POR MEDIO DE ENZIMAS INMOVILIZADAS DEL BANANO



Perfil físico - químico de manzana var. Ana no comercializable en Costa Rica

Se planteó una investigación para determinar el perfil físico-químico de la manzana variedad Ana, y usarlo como punto de partida en el desarrollo

de productos que puedan ser una alternativa de comercialización para la fruta que no se podrá ...

(ver pág. 12)

Aspectos de la elaboración de queso blanco en Costa Rica

El Consumo de "queso blanco", el mas popular en Costa Rica, se estima en 14.076 toneladas métricas/al año, lo que representa el 70% del consumo total de queso

en el país. Como queso blanco se conocen principalmente tres tipos de ese producto...

(ver pág. 17)

Revista Semestral publicada por el Centro de
Investigación en Tecnología de Alimentos

Director del CITA
Luis Fernando Arias M.

Editor
Ricardo Quirós C.

Consejo Editorial
Ing. Luis Fernando Arias Molina.
Ing. Fernando Aguilar Villarreal.
Ana Ruth Bonilla Leiva, M. Sc.
Víctor Lobo Di Palma, M. Sc.
Juan Manuel Esquivel Kruse, M. Sc.

Diagramación
Jeanina García U.

La responsabilidad de los trabajos firmados es de
sus autores y no del CITA, excepto cuando se
indique expresamente lo contrario.

La mención de cualquier empresa o
procedimiento patentado no supone su
aprobación por parte del CITA.

Los artículos incluidos en REVITECA pueden
reproducirse libremente siempre y cuando se
haga mención expresa de su procedencia y se
envíe copia al Consejo Editorial.

Correspondencia para canje y suscripciones
Universidad de Costa Rica - Centro de
Investigaciones en Tecnología de Alimentos
REVITECA
San José - Costa Rica
Telex UNICORI 2544
Tels. 25-98-85, 24-8027
25-55-55 ext. 701-212
Fax (506) 533762

La presente edición de REVITECA es
patrocinada por la Fundación para la
Investigación Agroindustrial Alimentaria
(FIAA).

**Caracterización de la interconversión de la sacarosa
por medio de enzimas inmovilizadas del banano.**
ANA R. BONILLA-LEIVA,
ARTHUR G. RAND. 1

**Evolución de la firmeza y el contenido de sólidos
solubles durante la maduración natural y artificial
de banano.**
TANNY LINDO-DELL,
MARTA BUSTAMANTE-MORA. 7

**Perfil físico - químico de manzana var. Ana no
comercializable en Costa Rica.**
ANA C. VELAZQUEZ-CARRILLO,
JORGE SOLANO ROSALES. 12

**Aspectos de la elaboración de queso blanco
en Costa Rica.**
RANDALL MAYORGA-JIMENEZ. 17

**Método de determinación de residuos de captafol
en plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) y suelo
por cromatografía de gases.**
JAIME E. GARCIA-GONZALEZ. 28

**Actividad proteolítica en látex de jatropha
oconitofolia.**
HERBERTH MADRIGAL-VILLA,
HUMBERTO TRIMIÑO-V.,
JOSE E. CARBALLO-A. 34

**Evaluación de la calidad del cacao seco en grano a
nivel nacional (cosecha 89-90).**
LUIS A. JIMENEZ-SILVA. 41

ACTIVIDAD PROTEOLITICA EN LATEX DE *JATROPHA OCONITOFOLIA*

Herberth MADRIGAL-VILLA*, Humberto TRIMIÑO-V**, José E. CARBALLO-A**

ABSTRACT

Latex proteolytic activity of the *Jatropha oconitofolia*

The latex extracted from *Jatropha oconitofolia* (Chicasquil) showed proteolytic activity. The proteolytic enzyme activity of the latex did not suffer changes when the solvent system used was 20% 1- propyl alcohol. Molecular weight, optimum pH and temperature were determined for the extracted fraction. A kinetic study was also performed.

RESUMEN

El látex extraído de *Jatropha oconitofolia* (Chicasquil), presentó actividad proteolítica. Para la extracción del látex, se probaron diversos sistemas de solventes de recolección, de los cuales el más indicado fue el 1- propanol al 20%, pues no afectó la actividad proteolítica de la enzima presente en el látex. Se determinaron el pH y la temperatura óptima para la acción proteolítica, el peso molecular de la fracción extraídos y se estudio la cinética enzimática.

INTRODUCCION

La especie *Jatropha oconitofolia* (Chicasquil) perteneciente a la familia *Euphorbiaceae*, es un árbol de procedencia centroamericana comúnmente conocido como Chicasquil. Las especies de esta familia se caracterizan porque las hojas generalmente son simples y alternas. El fruto, triangular, con eflorescencia, a veces presenta una espiga o seno muy modificado. Se encuentra cultivada en cercas alrededor de las casas y en fincas de mediana elevación. Es un arbusto o árbol pequeño que crece de 3 a 5 m de altura, y la capa es ligeramente aplanada y espesa. Sus flores son blancas en corimbos unisexuales, monoicas y con cáliz blanco de 5 piezas unidas en la base y sentadas sobre un disco amarillo. (Holdridge, 1944, Martin, 1979, Pittier, 1957).

En Costa Rica, el chicasquil se usa en comidas como una gustosa espinaca. También se ha usado en la elaboración de quesos y por sus propiedades medicinales.

La mayoría de las euforbiáceas segregan un líquido lechoso y coloreado conocido con el nombre de látex. Este látex consiste en un líquido matriz con pequeñas partículas orgánicas en suspensión coloidal. El líquido matriz puede ser considerado como un grupo celular que contiene diversas sustancias en solución coloidal como resinas gomas, hidrocarburos, sustancias nutritivas, ácidos orgánicos, sales, alcaloides, esteroides, grasas, compuestos tánicos y mucilágos. El látex puede contener gran cantidad de proteínas, enzimas proteolíticas, azúcares, así como oxalatos y malonatos. (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, 1978, Esau, 1965, Committee on Technology Innovation, 1973).

* Centro de Investigaciones en Tecnología de Alimentos.

** Universidad Nacional-Heredia, Costa Rica.

FE DE ERRATAS

En la pág. 34 el artículo Actividad Proteolítica en látex de *jatropha oconitofolia*

Léase *aconitofolia* y no *oconitofolia*

El látex del Chicasquil presenta una acción irritante sobre la piel, lo cual es un primer indicio de la presencia de enzimas proteolíticas. Según Fermis y Gerber (1972), la actividad proteolítica ha sido observada en las plantas euforbiáceas desde hace muchos años. Por ello el estudio sobre ellas se ha intensificado últimamente.

Se investigó la actividad proteolítica que presenta el látex extraído de *Jatropha oconitofolia* (Chicasquil), determinándose el pH y la temperatura óptima para dicha acción. Se hizo una pre-purificación del látex, se determinó la actividad enzimática y la acción de esta enzima sobre la leche, comparada con una renina comercial.

Con la investigación, se justifica la necesidad de continuar el estudio de esta enzima en cuanto a las alternativas para mejorar el tratamiento del látex (fresco y envejecido) a fin de usarlo en la coagulación de leche o en otros campos de la industria. Así como la necesidad de ampliar los conocimientos que se tienen acerca de estas plantas en nuestro país.

MATERIALES Y METODOS

Recolección del látex

Las muestras de látex se recolectaron de árboles localizados en el Cantón de Barva, provincia de Heredia. Se sangraron árboles, de 2 a 5 metros. Para ello se seleccionaron aquellos que tenían una superficie apta para las incisiones, con el fin de hacer el mínimo daño al árbol.

1. Período y tiempo de sangrado.

Como lo describe Viquez, A. 1958, la recolección de látex se hizo en época lluviosa, durante el cuarto creciente lunar, para obtener mayor cantidad.

Se recolectó material en tres momentos del día: de 6 a 8 am, de 12 a 1 pm y de 4 a 6 pm.

2. Método de sangrado.

Se realizaron incisiones en forma de V de 2 a 5 mm de espesor, tratando de que la incisión solo penetrara en la corteza, a fin de ocasionar el menor daño posible a la planta y facilitar su pronta recuperación. Los cortes se hicieron con instrumentos de vidrio, plástico o acero inoxidable, para evitar la oxidación del látex. (Madrigal, L.G. 1978; Hill, A. 1937).

Recolección y almacenamiento del látex.

El látex se recolectó en un principio según la metodología de Madrigal (1970) y de Chaverri (1983), en presencia de preservantes. Además se probó el uso de tubos de ensayo cubiertos con papel aluminio conteniendo 2 ml de buffer de fosfatos a diferentes pH (pH = 4 hasta pH = 9), introducidos en baño de hielo.

Como la recuperación del látex, a diferentes pH, resultó afectada por la formación de flóculos y poca potencia recuperada, entonces se recolectó el látex en balones de 50 ml conteniendo una solución al 20% de 1-propanol, recubiertos de papel aluminio introducidos en baño de hielo. Si no se estudiaba inmediatamente, se almacenaba a -30 °C.

Petratamiento del látex

Las muestras recolectadas se filtraron a fin de remover impurezas. Los filtrados se realizaron con tripas para peso molecular de 12000, con un ancho de 1/4" y un tamaño de poro de 3787-D50, contra solución propanol : agua (20:80), a 4 °C, por 24 horas. Se hizo una segunda diálisis contra tampón de fosfatos de pH 6.5. 0.02 M, por otras 24 horas, a 4 °C.

El dializado se transfirió a botellas plásticas, con recubrimiento de papel de aluminio, y se congeló, y se mantuvo a -30 °C, hasta su uso.

Estudio del látex

1. Estudio de la actividad proteolítica

A todas las muestras se les determinó la actividad proteolítica en las condiciones especificadas para el método según Anson Perlman, E.B. and L. Lorand (1976).

Por otra lado, se determinaron ciertas características enzimáticas importantes, a saber: pH óptimo, temperatura óptima, constantes cinéticas (K_m y V_{max}) según modelo de Michaelis-Menten, y distribución del peso molecular del componente proteico.

Cabe destacar tres aspectos: primero, siendo el enfoque de este estudio dirigido a la exploración inicial de las diferencias entre las proteasas de diversas especies, los óptimos de pH y temperatura se trabajaron a fin de ver tendencias más que números exactos; segundo: los valores obtenidos para estos análisis deben considerarse "aparentes" dado el poco nivel de pureza de las enzimas y la posible existencia de más de una enzima activa. Por último la cinética se siguió en condiciones que hiciesen posible la comparación de la actividad de las diversas especies entre si y cercanas a las usadas en la coagulación de la leche.

1.1 Determinación del pH óptimo

Se prepararon soluciones al 0.5 % de caseína en tampones 0.01 M en fosfatos de pH 6.0, 7.0, 8.0 y 9.0. Se determinó la concentración de proteína hidrolizada a tiempos de 0, 2, 5, 10, y 30 minutos a 37°C, para cada pH, y se usaron las concentraciones establecidas en el método de Anson modificado.

1.2 Determinación de temperatura óptima

La temperatura óptima se determinó usando el pH óptimo que se estimó en el paso anterior. Se incubaron las muestras a un rango de temperatura de 10 °C hasta 70 °C.

1.3 Definición de las constantes aparentes

Usando pH 7 y 37 °C se determinó la actividad proteolítica inicial (ver sección D), variando las concentraciones iniciales de sustratos. El resultado fué analizado gráficamente siguiendo la técnica de linearización de Lineweaver-Burk para el modelo de Michaelis-Menten (Con y Pk. Stumph, 1978, Braverman, J.B. 1980).

2. Estudio de la coagulación de la leche

Se siguió el método de Lorand, 1976 para definir la actividad coagulante de la enzima a 35 °C y pH 6.5

ANALISIS PRACTICADO EN LATEX

1. Análisis de actividad proteolítica

Para determinar la actividad proteolítica, se usó el método Awson in Perlman, E.G. and L. Lorand (1976), modificado con el combinado con la técnica de Lowry (Lorand, L. 1976) para proteínas, en lugar de la ninhidrina para la estimación de los productos solubles de la hidrólisis.

2. Estudio cromatográfico de la muestra

Cada muestra fué analizada cromatográficamente en columnas de Sephadex G-100. Farmacia Fine Chemicals en una columna de tipo K26 de la misma marca, en un flujo de 40 gotas/5 min para la muestra y los patrones. La columna se calibró con patrones cromatográficos a fin de estimar

el peso molecular de las proteínas presentes; de Blue dextran, aldolasa, eovalbmina Quimotripsinógeno y Ribonucleosa.

DISCUSION DE RESULTADOS

1. Determinación del solvente de extracción

Para recuperar la proteína de los flóculos formados en la colección de látex a diferentes pH, y obtener un mejor rendimiento de recuperación, se realizaron pruebas de solubilidad con algunos solventes orgánicos (acetona, éter etílico, éter de petróleo, acetato de etilo, 1-propanol) para poder disolver los flóculos y lograr extraer la mayor cantidad posible de enzima atrapada, sin afectar sus propiedades.

En el látex recogido en buffer de fosfatos de diferentes pH, contenidos en tubos de ensayo, se encontró que no se recupera toda la proteína en la solución, y la actividad proteolítica era en algunos casos medible en suspensiones de la fase coagulada, pero en otros casos no se podía determinar en el precipitado.

El uso de 1-propanol al 20% permitió la recuperación tanto de la mayoría de la proteína como de una mayor actividad proteolítica.

2. Extracción y preservación del látex

El ácido cítrico y el bisulfito de sodio (Chaverri, 1983; Madrigal 1978) se usaron como preservantes para tratar de mantener las propiedades del látex y la actividad proteolítica, pero esas sustancias provocaron la formación de flóculos, o gránulos de gran tamaño. Es probable que la alta cantidad de HCN que tiene su látex más los preservantes, hayan provocado una modificación en la actividad proteolítica y las propiedades de la enzima.

3. Determinación de pH óptimo

El extracto crudo de látex, pre-purificado por diálisis, presentó mayor actividad proteolítica a un pH cercano a 7 (Figura 1). A medida que el PH aumenta, se aleja de dicho valor y la actividad proteolítica del extracto crudo decae. Este resultado corroboró lo descrito por Fermi y Gerber (Perlman, 1976; Gerber, 1972) quienes encontraron que en este tipo de plantas las proteasas contenidas en látex poseen pH óptimos de 7. Como puede verse en la figura 1, existe un máximo relativamente estrecho, con pendientes que decrecen con rapidez a ambos lados.

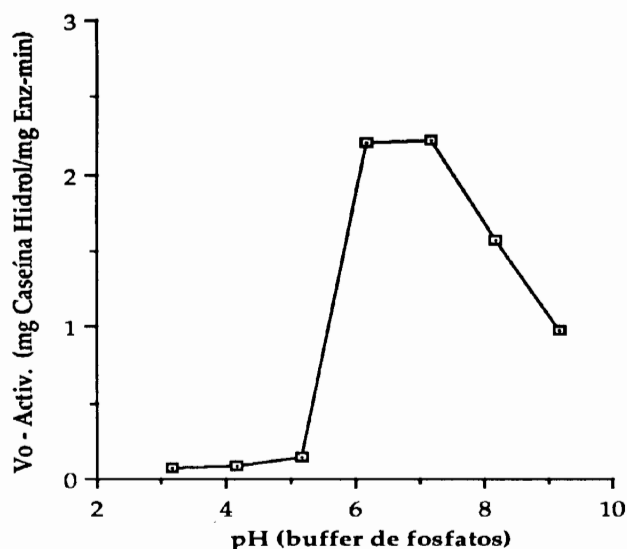


Fig. 1.: Efecto del pH sobre la actividad enzimática.

4. Determinación de temperatura óptima

La mayor actividad proteolítica se presentó a los 60°C (Figura 2). A 70°C, se presenta una disminución considerable de la actividad. La enzima se mantiene relativamente estable a temperaturas entre los 40°C y los 60°C, lo mismo que la actividad proteolítica.

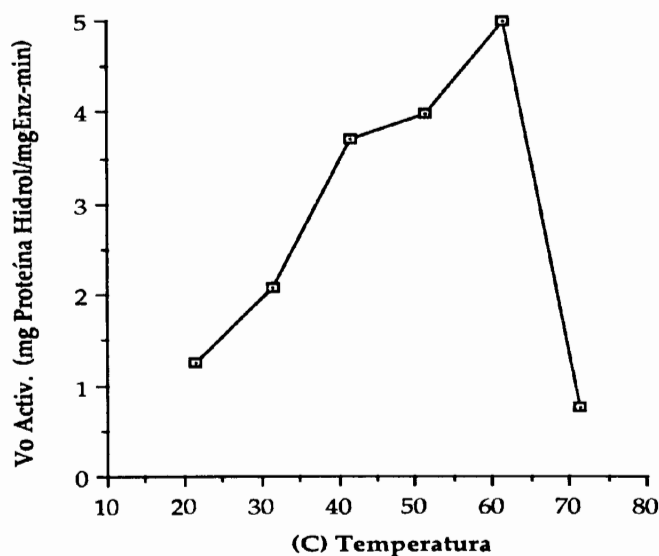


Fig. 2: Efecto de la temperatura sobre la actividad .

5. Cinética enzimática

Se determinó el comportamiento cinético de la enzima, tanto para látex fresco como para látex congelado, por aproximadamente una semana.

Cinética enzimática para extracto crudo fresco

El análisis de regresión lineal de Lineweaver-Burk (con un factor de correlación de 0.9588) da a lugar una $K_m = 1.56$ mg Caseína/mL mezcla reacción, $K_m = 1.55$ mg Proteína Hidrolizada /mg Proteína-min (Figura 3). Como la correlación fue baja, se tomaron aquellos puntos más representativos de la saturación. Se repitió el análisis de regresión lineal. Así, con un factor de correlación de 0.9981, se obtuvo una $K_m = 1.63$ mg Caseína/mL mezcla reacción y $V = 1.57$ mg proteína Hidrolizada/mg Proteína-min. Dado que los valores en ambos análisis K_m y V_m son similares, se puede considerar que siendo la enzima no purificada, se obtiene un comportamiento de Michaelis-Menten bastante aceptable. (Conn; 1978; Braverman 1980).

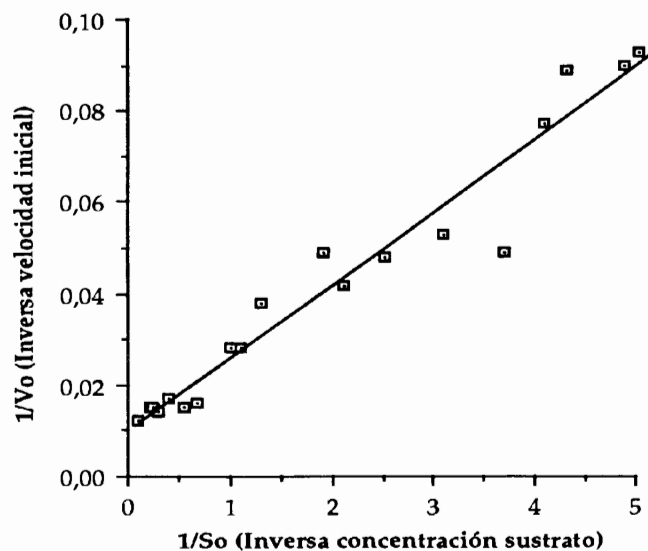


Fig. 3: Gráfica de Line Weaver - Burch para Latex puro

Cinética enzimática con extracto envejecido

El tratamiento de la muestra para un extracto envejecido, se realizó en condiciones como las descritas en el caso anterior. Se encontró que no responde a una cinética de Michaelis-Menten (Figura 4). Se presenta una saturación hasta 30 ug Proteína

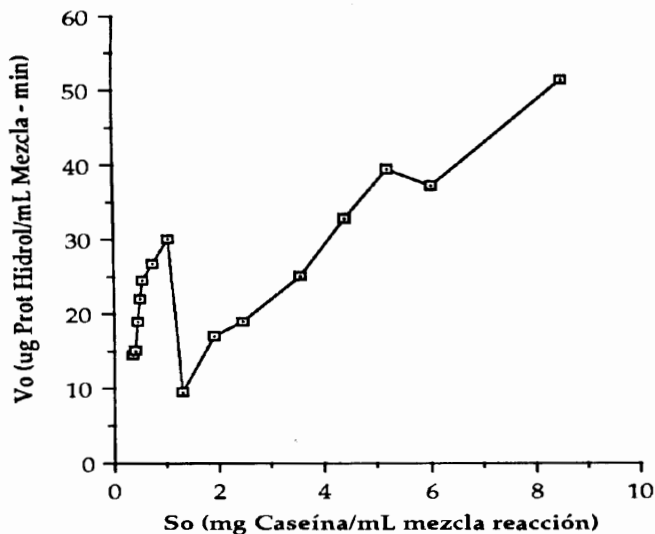


Fig. 4: Gráfica de Michaelis - Menten para Latex pre-purificado envejecido .

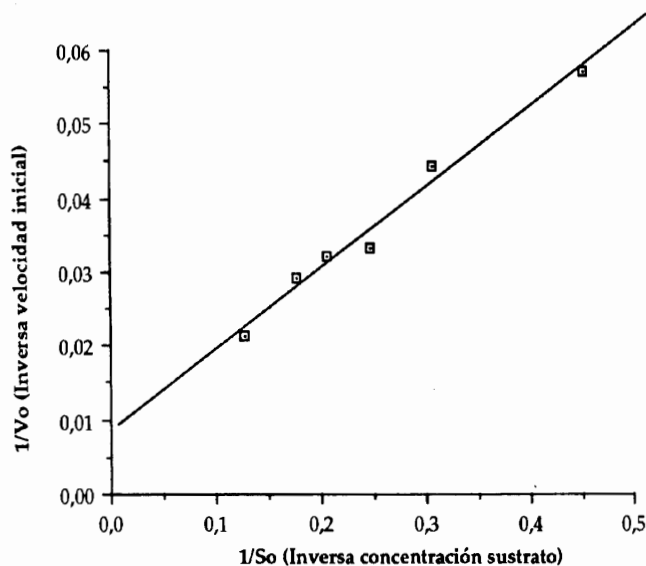


Fig. 5: Gráfica Line - Weaver Burck para primer grupo de datos de Latex pre-purificado envejecido.

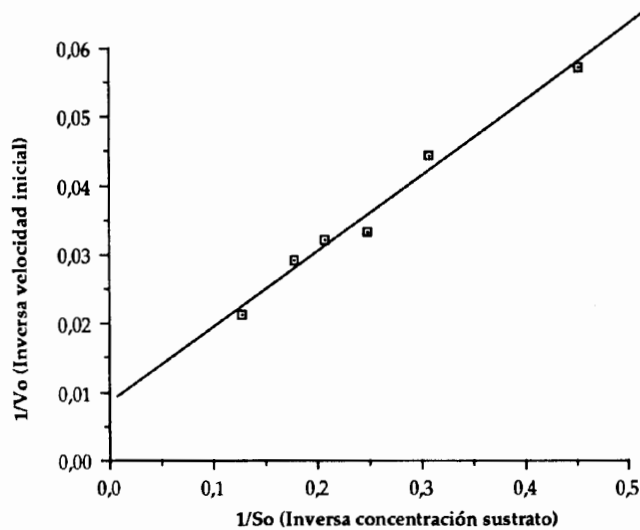


Fig. 6: Gráfica Line Weaver - Burck para segundo grupo de datos de Latex pre-purificado envejecido.

hidrolizada/mL mezcla-reacción min. Pero luego la velocidad inicial baja considerablemente para volver a alcanzar una velocidad de 50 ug Proteína hidrolizada/mL mezcla - reacción-min. Con este resultado es de suponer la degradación o cambio en el tiempo de la enzima, originando presumiblemente a dos formas activas. Para corroborar lo anterior, los valores obtenidos se dividen en dos grupos y así poder realizar un análisis de regresión lineal Lineweaver-Burk para obtener un comportamiento cinético Michaelis-Montom. El análisis de regresión lineal Lineweaver-Burk, para el primer grupo de valores da como resultado un factor de correlación = 0.992, $K_m = 1.56$ mg Caseína/ml mezcla reacción, $V_m = 1.92$ mg Proteína Hidrolizada/mg Proteína-min. (Figura 5). Para el segundo caso, se presenta un factor de correlación de 0,993, $K_m = 14.67$ mg Caseína/mL mezcla reacción y una $V_m = 2,05$ mg Proteína Hidrolizada mg Proteína-min (Figura 6).

Este comportamiento se puede justificar por lo siguiente:

- La existencia aparentemente de dos formas activas de enzimas, que pueden ser consecuencia de cadenas de péptidos producidos por ruptura en la molécula de enzima. Se produce una inhibición por el sustrato en una de las formas activas, mientras que la otra continúa hasta la saturación.
- La presencia de algún tipo de inhibidor en la primera fase de la saturación, que activa en un caso hasta determinada concentración de sustrato y que a la vez el inhibidor bloquea

los sitios activos de la otra. Puede presumirse también que existe en la segunda fase alguna sustancia que activa la enzima y continúa hasta la saturación.

6. Determinación del Peso Molecular

El tamizado molecular da como resultado un peso molecular de

116000 para la proteína presente en el extracto pre-purificado de látex. Sin embargo, la amplitud del pico para el extracto pre-purificado (Figura 7) es mucho mayor que la mostrada por los picos de las proteínas patrón (Figura 8). Dado que se usaron cantidades similares de proteína en ambos corridas cromatográficas, la diferencia de amplitud puede indicar la presencia de más de una proteína de pesos moleculares cercanos.

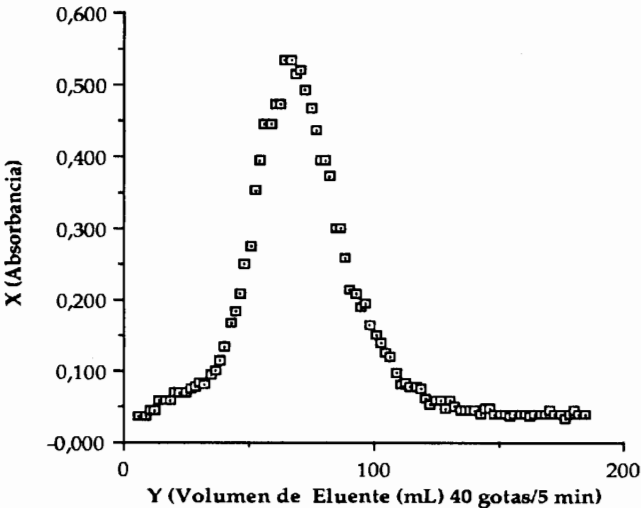


Fig. 7: Corrida cromatográfica de extracto crudo de Latex.

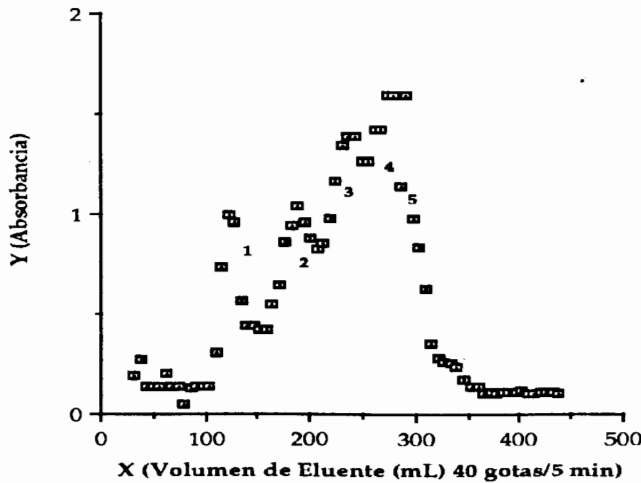


Fig. 8: Corrida cromatográfica de patrones de proteína.
1- B. DEXT, 2- ALDOL, 3- OVOAL, 4- QUIMOT, 5- RIBO.

No se pudo obtener recuperación de actividad proteolítica en ninguna de las fracciones. posiblemente a causa de :

- Deterioro o eliminación del complejo activado de la enzima. La ruptura parcial de la molécula de la enzima, ocasiona eliminación de algún péptido pequeño, que como consecuencia la inactiva.
- La ausencia de sustancias (iones, péptidos, etc.) que actúan sobre la molécula y pueden activar la enzima, o bien alguna sustancia inhibidora presente en el extracto crudo, que no permitió la reacción enzimática y que no se separó de la enzima.

7. Actividad del chicasquil en la leche

La actividad del extracto crudo de Chicasquil en la leche es casi una tercera parte de lo que presenta la resina comercial. El látex presenta una actividad de 34.20 UN actividad /mg proteína y la resina 94.10 UN actividad /mg proteína (Cuadro 1).

CUADRO 1

Comparación de la actividad proteolítica de chicasquil con el cuajo en la leche

ENZIMA	TIEMPO seg	CANTIDAD PROTEINA mg	ACTIVIDAD UN actividad/ mg Proteína
Latex	60,00	11,70	34,20
Cuajo	60,00	4,25	94,10

Para comprar la actividad del látex de Chicasquil con la renina, se realizó de acuerdo al tiempo de coagulación.
60 seg = 400 UN Actividad.

En condiciones de temperatura y pH necesarios para una enzima comercial, el chicasquil produjo coágulos de consistencia semejante al presentado por la renina. La aparición de los primeros coágulos con respecto al tiempo fue mayor, pero las propiedades físicas, forma, tamaño y consistencia fueron muy comparables a las impartidas al coágulo por la enzima comercial.

Entre los factores que pueden influir en la diferencia del tiempo de coagulación están:

- La enzima presente en el látex posee menor actividad específica.
- La enzima del chichasquil modifica al sustrato de manera diferente a la del cuajo comercial, en la forma de ataque.
- La presencia de inhibidores en el extracto de látex que no ha sido purificado, y puedan bloquear la actividad enzimática.
- La necesidad de algún ión que active la enzima, pues algunas, como en el caso de la renina y otros agentes comerciales, traen dosificaciones de iones calcio y sodio que favorecen la reacción enzimática.

Los factores antes mencionados deben ser tomados en consideración, pues las condiciones en que se trabajó son muy cercanas a las condiciones reales. Así, los resultados obtenidos son bastante promisorios en lo relativo a la utilización de la enzima para coagulación de la leche.

CONCLUSIONES

Se encontró que para coleccionar el látex, el 1-propanol al 20 % mostró ser el mejor solvente de extracción comparado con otros, pues la actividad enzimática no se ve afectada. Los agentes preservantes (bisulfito de sodio y citrato de sodio) provocan a la hora de coleccionar el látex una modificación de las propiedades físicas, de tal manera que se aglutina impidiendo la recuperación de la actividad proteolítica en la solución.

La enzima presente en el látex presenta mayor actividad proteolítica a pH cercanos a 7, es decir que existe un máximo relativamente estrecho en el que la enzima es más activa. La temperatura máxima de actividad proteolítica de la enzima se encuentra en un intervalo de 40 °C a 60 °C. Sin embargo, a mayores temperaturas, la enzima es estable por menor tiempo. Aunque es de esperar que la enzima no sea activa a bajas temperaturas (0 a 4 °C, o aun bajo cero), se debe hacer notar que hay cambios en el comportamiento cinético de la enzima almacenada a baja temperatura, que sugieren alteraciones por autoproteólisis.

A medida que el extracto crudo de látex envejece, a una temperatura bajo cero, parecen ocurrir cambios en la estructura de la enzima. Esto se observa en los resultados de k_m y V_{max} obtenidos para la cinética enzimática del extracto de látex envejecido. Mientras que para una cinética de extracto fresco de látex, los resultados de k_m y V_{max} indican la existencia de una enzima, en el extracto envejecido parece haber dos formas enzimáticas presentes.

Según la curva de patrones referente a pesos moleculares, el peso

molecular encontrado en la enzima presente en el látex es de 116000. El pico tan amplio obtenido del tamizado molecular indica que podrán estar presentes varias proteínas de peso molecular muy similar. Se debe recordar que no se recuperó actividad enzimática en ninguna de las fracciones. La proteasa presente en el látex es una posible fuente de coagulación de leche e indica el posible uso de enzimas extraídas de plantas vegetales en el ablandamiento de carnes, clarificación de cervezas, como sustituto de la renina en la manufactura de quesos y otros. En este caso la actividad proteolítica de esta enzima es un 30 % de la actividad presentada por la renina.

BIBLIOGRAFIA

BRAVERMAN, J.B.S. 1980. Introducción a la Bioquímica de Alimentos. El Manual Moderno S.A. México D.F.

COMMITTEE on TECHNOLOGY INNOVATION. 1973. Tropical Plants With Promising Economic Value. Comisión on International México. Limusa: 631 p.

CONSEJO NACIONAL de CIENCIA y TECNOLOGIA. 1978. Guayule, Reencuentro con el Desierto. 2 ed. México D.F. p. 124.

EUSAU, K. 1965. Anatomía Vegetal. Barcelona: Omega.

HILL, A.F. 1937. Economic Botany. New York. Mc Graw Hill. p. 158.

LORAND, L. 1976. Methods in Entomology". 1976. London. Academic Press: V. 5. p. 26-28.

MOLDRIDGE, C.R.; POVEDA, L. 1944. Árboles de Costa Rica. Publicaciones Científicas Tropicales. San José. p. 226.

MADRIGAL, S. L. G. 1978. Efecto de algunas variedades sobre el rendimiento de la papaína cruda. Tesis Lic. en Tecnología de Alimentos. San José. Universidad de Costa Rica. Carrera Interdisciplinaria en Tecnología de Alimentos.

MARTIN, F.W. and RUBERTE, R. M. 1979. Edible Leaves of Tropics. Sowntham Region Science and Education Administration. Department of Agriculture. Puerto Rico. Cap. II. p. 49

PITTIER, M. 1957. Ensayo sobre plantas usuales de Costa Rica. 2 ed. San José. Editorial Universitaria.

VIQUEZ, A. 1958. Investigación de la cocción vermífuga de tres especies de hicus que crecen en Costa Rica. p. 226.