



**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



MODALIDAD INVESTIGACIÓN

TEMA:

“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE LA ENZIMA BROMELINA OBTENIDA DE LA CORTEZA DE *Ananas comosus*, SOBRE EXTRACTO ACUOSO DE CARNE”

**TRABAJO DE TITULACIÓN PRESENTADO COMO REQUISITO PREVIO
PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICA Y FARMACÉUTICA**

AUTORA:

KATHERIN ABIGAIL DEL PEZO SOLÍS

TUTORA:

Q. F. NILDA CEDEÑO. MSc.

GUAYAQUIL – ECUADOR

2018



REPOSITORIO NACIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA

FICHA DE REGISTRO DE TESIS/TRABAJO DE GRADUACIÓN

TÍTULO Y SUBTÍTULO:	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE LA ENZIMA BROMELINA OBTENIDA DE LA CORTEZA DE <i>Ananas comosus</i> , SOBRE EXTRACTO ACUOSO DE CARNE.		
AUTOR(ES) (apellidos/nombres):	DEL PEZO SOLÍS KATHERIN ABIGAIL		
REVISOR(ES)/TUTOR(ES) (apellidos/nombres):	Q.F. LEILA PRÍAS MOGRO M.Sc (REVISORA) Q. F. NILDA CEDEÑO. MSc. (TUTORA)		
INSTITUCIÓN:	UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL		
UNIDAD/FACULTAD:	FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS		
MAESTRÍA/ESPECIALIDAD:	NO APLICA		
GRADO OBTENIDO:	QUÍMICA Y FARMACÉUTICA		
FECHA DE PUBLICACIÓN:	No. DE PÁGINAS:	77	
ÁREAS TEMÁTICAS:	BIOQUÍMICA		
PALABRAS CLAVES/ KEYWORDS:	Bromelina, enzima proteolítica, enlace peptídico, actividad proteolítica.		
RESUMEN/ABSTRACT:	<p>La dureza de la carne es un inconveniente en la comercialización y consumo humano; por otro lado en Ecuador hay abundancia de <i>Ananas comosus</i> (piña), fruta tropical, con actividad proteolítica debido a la presencia de Bromelina, constituyendo una alternativa natural, como ablandador de carnes. Este trabajo, busca demostrar el efecto proteolítico de la Bromelina sobre las carnes de bovinos; se utilizó extracto acuoso de carne como sustrato proteico y se añadió extracto etanólico de Bromelina extraída mediante el método de precipitación alcohólica al 75, 90 y 95%, y reconstituida con agua destilada, se llevó el complejo enzima-sustrato a baño de maría a 37°C, para la medición enzimática se realizó una curva de calibración a diferentes concentraciones y se cuantificó la actividad proteolítica de la enzima por el método de Biuret a intervalos de 15, 30, 45 y 60 minutos por separado, hasta la ruptura de los enlaces peptídicos, que liberó aminoácidos asimilables de la proteína de la carne. Se demostró la actividad proteolítica determinando el contenido de proteínas por el método de Biuret, puesto que ésta reacción se debe a los enlaces peptídicos que son hidrolizados por la Bromelina y ayuda a que la textura de la carne sea más suave. Se concluye que la fracción etanoica de Bromelina al 75% presentó una mayor capacidad proteolítica 46.4% en comparación con las fracciones etanólicas al 90 y 95%.</p>		
ADJUNTO PDF:	<input checked="" type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO	
CONTACTO CON AUTOR/ES:	Teléfono: 0939350500	E-mail: kdelpesosolis@gmail.com	
CONTACTO CON LA INSTITUCIÓN:	Nombre: UNIDAD DE TITULACIÓN		
	Teléfono: 04-229-3680		
	E-mail: www.fcq.ug.edu.ec		

Guayaquil, 3 de Septiembre del 2018

M.SC. CARLOS SILVA HUILCAPI M.Sc.
VICEDECANO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
Ciudad.-

De mis consideraciones:

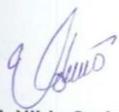
Envió a Ud. El informe correspondiente a la tutoría realizada al Trabajo de Titulación: **Determinación de la actividad proteolítica de la enzima bromelina obtenida de la corteza de *Ananas comosus*, sobre extracto acuoso de carne**, de la estudiante **DEL PEZO SOLÍS KATHERIN ABIGAIL** indicando ha cumplido con los parámetros establecidos en la normativa vigente:

- El trabajo es el resultado de una investigación.
- El estudiante demuestra conocimiento integral.
- El trabajo presenta una propuestas en el área de conocimiento.
- El nivel de argumentación es coherente con el campo de conocimiento.

Adicionalmente, se adjunta el certificado de porcentaje de similitud y la valoración del trabajo de titulación con la respectiva calificación.

Dando por concluida esta tutoría de trabajo de titulación, **CERTIFICO**, para los fines pertinentes, que la estudiante esta apta para continuar con el proceso de revisión final.

Atentamente,



Q. F. Nilda Cedeño. MSc.

Guayaquil, 3 de Septiembre del 2018

Q.F. CARLOS SILVA HUILCAPI, M.Sc
VICEDECANO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
Ciudad.-

De mis consideraciones:

Envío a Ud. el Informe correspondiente a la **REVISIÓN FINAL** del Trabajo de **Titulación** “**Determinación de la actividad proteolítica de la enzima Bromelina obtenida de la corteza de *Ananas comosus*, sobre extracto acuoso de carne**” de la estudiante **Katherin Abigail Del Pezo Solís**. Las gestiones realizadas me permiten indicar que el trabajo fue revisado considerando todos los parámetros establecidos en las normativas vigentes, en el cumplimiento de los siguientes aspectos:

Cumplimiento de requisitos de forma:

- El título tiene un máximo de **21** palabras.
- La memoria escrita se ajusta a la estructura establecida.
- El documento se ajusta a las normas de escritura científica seleccionadas por la Facultad.
- La investigación es pertinente con la línea y sublíneas de investigación de la carrera.
- Los soportes teóricos son de máximo **9** años.
- La propuesta presentada es pertinente.

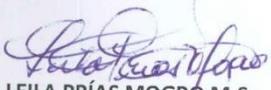
Cumplimiento con el Reglamento de Régimen Académico:

- El trabajo es el resultado de una investigación.
- El estudiante demuestra conocimiento profesional integral.
- El trabajo presenta una propuesta en el área de conocimiento.
- El nivel de argumentación es coherente con el campo de conocimiento.

Adicionalmente, se indica que fue revisado, el certificado de porcentaje de similitud, la valoración del tutor, así como de las páginas preliminares solicitadas, lo cual indica que el trabajo de investigación cumple con los requisitos exigidos.

Una vez concluida esta revisión, considero que la estudiante **Katherin Abigail Del Pezo Solís**, están aptas para continuar el proceso de titulación. Particular que comunicamos a usted para los fines pertinentes.

Atentamente,

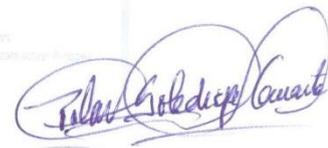
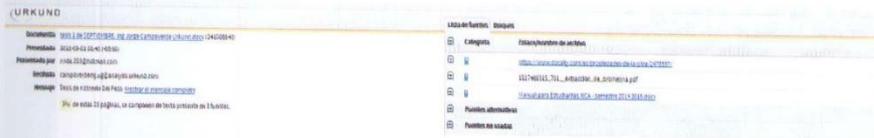


Q.F. LEILA PRÍAS MOGRO M.Sc
C.I. 1301548887

CERTIFICADO PORCENTAJE DE SIMILITUD

Habiendo sido nombrada Nilda Cedeño, tutora del trabajo de titulación certifico que el presente trabajo de titulación ha sido elaborado por Katherin Abigail Del Pezo Solís, C.C.:120768911-6, con mi respectiva supervisión como requerimiento parcial para la obtención del título de Química y Farmacéutica.

Se informa que el trabajo de titulación: **“Determinación de la actividad proteolítica de la enzima bromelina obtenida de la corteza de *Ananas comosus*, sobre extracto acuoso de carne”**, ha sido orientado durante todo el periodo de ejecución en el programa antiplagio (URKUND) quedando el 3% de coincidencia.




Q. F. Nilda Cedeño. MSc.
FIRMA DEL DOCENTE TUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN



URKUND

Urkund Analysis Result

Analysed Document: tesis 1 de SEPTIEMBRE. Ing Jorge Campoverde Urkund.docx (D41086640)
Submitted: 9/1/2018 3:40:00 PM
Submitted By: nilda.253@hotmail.com
Significance: 3 %

Sources included in the report:

1527469315_701__extraccion_de_bromelina.pdf (D40387188)
Manual para Estudiantes.NCA - semestre 2014 2015.docx (D12499810)
<https://www.docsity.com/es/propiedades-de-la-pina/2470557/>

Instances where selected sources appear:

11



Jorge Campoverde

LICENCIA GRATUITA INTRANSFERIBLE Y NO EXCLUSIVA PARA EL USO NO COMERCIAL DE LA OBRA CON FINES NO ACADÉMICOS

Yo, **DEL PEZO SOLÍS KATHERIN ABIGAIL** con C.I. No. 1207689116, certifico que los contenidos desarrollados en este trabajo de titulación, cuyo título es “**Determinación de la actividad proteolítica de la enzima bromelina obtenida de la corteza de *Ananas comosus*, sobre extracto acuoso de carne**” son de mi absoluta propiedad y responsabilidad Y SEGÚN EL Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN*, autorizo el uso de una licencia gratuita intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la presente obra con fines no académicos, en favor de la Universidad de Guayaquil, para que haga uso del mismo, como fuera pertinente



DEL PEZO SOLÍS KATHERIN ABIGAIL
C.I: 1207689116

*CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN (Registro Oficial n. 899 - Dic./2016) Artículo 114.- De los titulares de derechos de obras creadas en las instituciones de educación superior y centros educativos.- En el caso de las obras creadas en centros educativos, universidades, escuelas politécnicas, institutos superiores técnicos, tecnológicos, pedagógicos, de artes y los conservatorios superiores, e institutos públicos de investigación como resultado de su actividad académica o de investigación tales como trabajos de titulación, proyectos de investigación o innovación, artículos académicos, u otros análogos, sin perjuicio de que pueda existir relación de dependencia, la titularidad de los derechos patrimoniales corresponderá a los autores. Sin embargo, el establecimiento tendrá una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra con fines académicos.

CERTIFICADO DE APROBACIÓN DEL TUTOR

Guayaquil, 21 de Agosto del 2018

En calidad de tutor(a) del Trabajo de Titulación, certifico que he asesorado, guiado y revisado el Trabajo de Titulación en la modalidad de investigación, cuyo título es **“Determinación de la actividad proteolítica de la enzima bromelina obtenida de la corteza de *Ananas comosus*, sobre extracto acuoso de carne”** presentado por DEL PEZO SOLÍS KATHERIN ABIGAIL, con cédula de ciudadanía N° 120768911-6, previo a la obtención del título de Química y Farmacéutica.

Este trabajo ha sido aprobado en su totalidad y se adjunta el informe de antiplagio del programa URKUND. Lo Certifico.



Q. F. Nilda Cedeño. MSc.
TUTORA DE TESIS

CERTIFICADO DEL TUTOR REVISOR

Guayaquil, 3 de Septiembre del 2018

Habiendo sido nombrado LEILA PRÍAS MOGRO, tutor del Trabajo de Titulación **“Determinación de la actividad proteolítica de la enzima bromelina obtenida de la corteza de *Ananas comosus*, sobre extracto acuoso de carne”** certifico que el presente Trabajo de Titulación, elaborado por DEL PEZO SOLÍS KATHERIN ABIGAIL, con C.I. No. 1207689116, con mi respectiva supervisión como requerimiento parcial para la obtención del título de QUÍMICA y FARMACÉUTICA , en la Carrera/Facultad de Ciencias Químicas, ha sido **REVISADO Y APROBADO** en todas sus partes, encontrándose apto para su sustentación.



Q.F. LEILA PRÍAS MOGRO MSc.
DOCENTE TUTOR REVISOR
C.I.: 1301548887

CERTIFICADO DEL TRIBUNAL

Acta de Registro de la sustentación Oral

El Tribunal de Sustentación del Trabajo de Titulación de Katherin Abigail Del Pezo Solís, con cedula de ciudadanía N° 1207689116 después de ser examinada en su presentación, memoria científica y defensa oral, da por aprobado el Trabajo de Titulación.



FIRMA

Q.F. LEILA PRÍAS MOGRO M.Sc.
Presidente – Miembro 1 del Tribunal



FIRMA

Q.F. GLENDA SARMIENTO M.Sc.
Docente–Miembro 2 del Tribunal



FIRMA

Q.F. AIDA CASTRO M.Sc.
Docente–Miembro 3 del Tribunal



FIRMA

Ab. Francisco Palomeque Romero
Secretario General

CARTA DE AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Guayaquil, 3 de Septiembre del 2018

Yo, KATHERIN ABIGAIL DEL PEZO SOLÍS, con cédula de identidad, 120768911-6 autora de este trabajo, declaro ante las autoridades de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guayaquil, que la responsabilidad del contenido de este TRABAJO DE TITULACIÓN, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guayaquil.

Declaro también es de mi autoría, todo el material escrito, salvo el que está debidamente referenciado en el texto. Además ratifico que este trabajo no ha sido parcial, ni totalmente presentado para la obtención de un título, ni en una Universidad nacional, ni extranjera.



DEL PEZO SOLÍS KATHERIN ABIGAIL
C.I: 1207689116

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por la vida que me ha regalado hasta el día de hoy, y la oportunidad que me brinda de ser una profesional al servicio del país y la sociedad.

Agradezco inmensamente a mis padres y hermanos por el apoyo incondicional brindado con amor y confianza, y por proveerme de todo lo necesario para que sea una profesional.

A mi esposo, que es mi todo en esta vida, que me ha dado inclusive sus oportunidades para que yo crezca; que ha estado ahí siempre para apoyarme con tanto cariño y cuidado.

A mis hijos Alejandro y Adriana por su comprensión y el amor manifestado de muchas formas fueron los que me impulsaron a terminar este proyecto

A la Universidad de Guayaquil, a la Facultad de Ciencias Química, a sus autoridades y así como a los docentes, quienes fueron parte fundamental en este largo proceso de formación profesional, que con sus conocimientos y orientación han aportado significativamente a este logro personal.

A mi tutora del Trabajo de Titulación Q. F. Nilda Cedeño. M.Sc., quien con sus conocimientos y experiencia fue guía fundamental en este trabajo, corrigiéndome y apoyándome incondicionalmente en el desarrollo del mismo, y a quien estimo mucho.

Gracias a todos ustedes por haber sido parte de este trabajo y estar en cada etapa del mismo.

Katherin Abigail Del Pezo Solís

DEDICATORIA

La presente tesis es la consecuencia de cinco años de estudio, perseverancia y dedicación, el que culmina con una etapa en el largo camino de la vida y me lleva a recordar con gratitud a quienes contribuyeron para la consecución de una nueva meta en mi vida, es por esto que dedico el presente trabajo primeramente a Dios, por darme salud, fortaleza y sabiduría para llegar hasta estas instancias.

A mis padres Ángel Del Pezo Castillo y María Solís Alarcón quienes me han apoyado moral, emocional y económicamente todos los días de mi vida, y nunca me ha faltado amor y consejos de su parte, siempre guiándome en el camino de Dios; han sido un pilar fundamental para seguir adelante generando una motivación para nunca rendirme.

A mi hermana Angélica y mis hermanos Fraichy y Roosevelt, por ser la alegría de mi vida en todo momento. A mi familia entera que de una u otra forma han influido en mi vida.

A mí esposo Andrés Flores Vélez por ser mi amigo, mi confidente y el dueño de mis sentimientos, con quien he vivido momentos felices y quien me ha ayudado en mi carrera universitaria.

A mis hijos Alejandro y Adriana por ser fuente de inspiración y motivación para dirigirme hacia mis objetivos.

A mis abuelos Melchor Solís y Angélica Alarcón, quienes fueron las personas después de mis padres que más se preocuparon por mí. Sus canas eran sinónimos de sabiduría, me enseñaron muchas cosas vitales para la vida y me encaminaron por el buen sendero.

A mis suegros Kleber Flores y Aracelly Vélez quienes considero mucho por todo lo vivido y a mis cuñados/cuñadas por haber llegado a formar parte de mi diario vivir.

Katherin Abigail Del Pezo Solís

ÍNDICE

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	9
CAPÍTULO I	10
JUSTIFICACIÓN	10
FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	11
HIPÓTESIS	11
OBJETIVOS	11
Objetivo general	11
Objetivos específicos	11
VARIABLES DE LA INVESTIGACIÓN	12
Variable dependiente	12
Variables independientes	12
CAPÍTULO II	13
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	13
Antecedentes	13
FUNDAMENTOS TEÓRICOS	14
Enzimas	14
Clasificación de las enzimas	15
Enzima Bromelina	16
Descripción	16
Características de la Bromelina	16
Composición química de la Bromelina	17
Propiedades químicas	18
Propiedades físicas	18

Usos.....	19
Familia Bromeliaceae.....	20
Generalidades.....	20
Piña.....	21
Descripción.....	21
Características de la piña.....	21
Variedades de piña.....	21
Cayena lisa.....	21
Panare.....	22
Española roja.....	22
Perola.....	22
Perolera.....	22
Burmanguesa.....	23
Proteínas.....	23
Descripción.....	23
Digestión de proteínas.....	23
Absorción de aminoácidos.....	24
Proteínas de origen animal.....	24
Carne.....	25
Composición química.....	26
Agua.....	26
Proteínas.....	26
Grasas.....	27
Carbohidratos.....	28

Valor nutritivo de la carne.....	29
Textura de la carne.....	31
Dureza de la carne.....	31
CAPÍTULO III.....	32
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	32
METODOLOGÍA.....	32
Tipo de investigación.....	32
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	33
Obtención de Bromelina por precipitación alcohólica.....	34
Selección de piña.....	34
Pelado y pesado de la corteza de piña.....	34
Licuada de la corteza de piña.....	34
Medición del volumen obtenido de la corteza licuada.....	34
Adición de Etanol.....	35
Enfriamiento/reposo.....	35
Centrifugación.....	35
Precipitado proteínico obtenido.....	35
Cuantificación de proteínas totales.....	36
Curva estándar por el método de Biuret.....	36
Curva estándar para proteínas por el método de Lowry.....	37
Procedimiento para la determinación de proteínas en la Bromelina obtenida por el método de Lowry.....	40
Procedimiento de preparación del extracto acuoso de carne.....	42
Determinación de proteínas por el método de Biuret.....	42
Hidrolisis del extracto acuoso de carne por la enzima Bromelina.....	44

MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS	44
CAPÍTULO IV	45
RESULTADOS Y DISCUSION	45
Resultados de proteínas por Biuret.....	45
Resultados de proteínas por Lowry.....	46
CAPITULO V	52
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	52
Conclusiones.....	52
Recomendaciones.....	53
BIBLIOGRAFÍA	54
ANEXOS	56
GLOSARIO	63
ABREVIATURAS	64

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA I: Operacionalización de las variables.....	12
TABLA II: Clasificación de las enzimas.....	15
TABLA III: Composición química de la Bromelina del fruto.....	17
TABLA IV: Distribución de la Bromelina en la piña.....	18
TABLA V: Propiedades físicas de la Bromelina.....	19

TABLA VI: Distribución de las proteínas en el tejido muscular.....	27
TABLA VII: Análisis químico aproximado de la mayoría de las carnes.....	29
TABLA VIII: Composición nutricional de las carnes por 100 g.....	30
TABLA IX: Determinación de proteínas totales en el extracto de carne.....	46
TABLA X: Determinación de proteínas totales en la Bromelina, método de Lowry.....	47
TABLA XI: Determinación de proteínas totales por el método de Lowry en los tres extractos.....	47
TABLA XII: Determinación de la actividad proteolítica de la enzima Bromelina.....	48
TABLA XIII: Determinación de la actividad proteolítica de la Bromelina en tres extractos.....	49
TABLA XIV: Porcentaje de proteína hidrolizada.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la Bromelina.....	19
Figura 2. Carne.....	25

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRAFICO I: Curva estándar de calibración para proteínas totales por el método de Biuret.....	37
----------------------------------------------------------------------------------------------	----

GRAFICO II: Curva estándar de calibración para proteínas totales por el método de Lowry.....	38
GRAFICO III: Concentración de Bromelina extraída con etanol de 95%, 90% y 75%.....	48
GRAFICO IV: Tiempo de exposición vs concentración obtenida.....	49
GRAFICO V: Porcentaje de proteínas hidrolizadas y sin hidrolizar.....	50

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

DIAGRAMA I: Obtención de Bromelina.....	33
DIAGRAMA II: Determinación de proteínas en Bromelina.....	39
DIAGRAMA III: Obtención del extracto acuoso de carne.....	41
DIAGRAMA IV: Hidrólisis de proteínas.....	43

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO I: Obtención de la enzima Bromelina a partir de la corteza de <i>Ananas comosus</i>	57
ANEXO II: Obtención del extracto acuoso de carne de bovino.....	59
ANEXO III: Determinación de proteínas totales en el extracto acuoso de carne por Biuret.....	59
ANEXO IV: Determinación de proteínas totales en el extracto acuoso de Bromelina por el método de Lowry.....	60
ANEXO V: Determinación de la actividad enzimática de la Bromelina sobre el extracto acuoso de carne por el método de Biuret.....	60
ANEXO VI: Cálculo para la determinación de proteínas totales por el método de Biuret.....	62
ANEXO VII: Cálculo para la determinación de proteínas totales por el método de Lowry.....	63

Determinación de la actividad proteolítica de la enzima Bromelina obtenida de la corteza de *Ananas comosus*, sobre extracto acuoso de carne.

RESUMEN

La dureza de la carne es un inconveniente en la comercialización y consumo humano; por otro lado en Ecuador hay abundancia de *Ananas comosus* (piña), fruta tropical, de la familia Bromeliaceae, con actividad proteolítica debido a la presencia de Bromelina, constituyendo una alternativa natural, como ablandador de carnes de bovino. La Organización Mundial de la Salud (OMS), recomienda consumir 500g /semana de carnes rojas y de acuerdo a la encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT), el consumo de carnes en el Ecuador es de 165g.per cápita/día, aproximadamente. Este trabajo, busca demostrar el efecto proteolítico de la enzima Bromelina sobre las carnes de bovinos; se utilizó extracto acuoso de carne como sustrato proteico y se añadió extracto etanólico de Bromelina extraída mediante el método de precipitación alcohólica al 75, 90 y 95%, y reconstituida con agua destilada, se llevó el complejo enzima-sustrato a baño de maría a 37°C, para la medición enzimática se realizó una curva de calibración a diferentes concentraciones y se cuantificó la actividad proteolítica de la enzima por el método de Biuret a intervalos de 15, 30, 45 y 60 minutos por separado, hasta la ruptura de los enlaces peptídicos, que liberó aminoácidos asimilables de la proteína de la carne. Se demostró la actividad proteolítica determinando el contenido de proteínas por el método de Biuret, puesto que ésta reacción se debe a los enlaces peptídicos que son hidrolizados por la Bromelina y ayuda a que la textura de la carne sea más suave. Se concluye que la fracción etanólica de Bromelina al 75% presentó una mayor capacidad proteolítica 46.4% en comparación con las fracciones etanólicas al 90 y 95%.

Palabras claves: Bromelina, enzima proteolítica, enlace peptídico, actividad proteolítica.

ABSTRACT

Determination of the proteolytic activity of the enzyme Bromelain obtained from the bark of *Ananas comosus*, on aqueous extract of meat.

The hardness of the meat is an inconvenience in the commercialization and human consumption; On the other hand, in Ecuador there is abundance of *Ananas comosus* (pineapple), tropical fruit, of the Bromeliaceae family, with proteolytic activity due to the presence of Bromelain, constituting a natural alternative, as a tenderizer of bovine meat. The World Health Organization (WHO) recommends consuming 500g / week of red meat and according to the National Health and Nutrition Survey (ENSANUT), the meat consumption in Ecuador is 165g.per cápita / day, approximately. This work, seeks to demonstrate the proteolytic effect of the Bromelain enzyme on bovine meat; aqueous extract of meat was used as a protein substrate and ethanolic extract of Bromelain extracted by the 75, 90 and 95% alcoholic precipitation method was added, and reconstituted with distilled water, the enzyme-substrate complex was brought to 37 ° C, for the enzymatic measurement, a calibration curve was made at different concentrations and the proteolytic activity of the enzyme was quantified by the Biuret method at intervals of 15, 30, 45 and 60 minutes separately, until the bonds rupture peptides, which released assimilable amino acids from the protein of the meat. Proteolytic activity was demonstrated by determining the protein content by the Biuret method, since this reaction is due to the peptide bonds that are hydrolyzed by Bromelain and helps the texture of the meat to be smoother. It is concluded that the ethanoic fraction of Bromeline at 75% presented a greater proteolytic capacity 46.4% compared to the ethanolic fractions at 90 and 95%.

Key words: Bromelain, proteolytic enzyme, peptide bond, proteolytic activity.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas pertenecientes al grupo de las proteasas catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas, por tanto, su uso en la industria alimenticia tiene mucha importancia. (Reyes y Aguilar, 2011; Errasti, 2013)

La piña es una fruta tropical que pertenece a la familia Bromeliaceae, es rica en vitaminas como la A, B, C y su actividad proteolítica se debe a la Bromelina que contiene grupos sulfhidrilos que son de vital importancia en la catálisis; esta enzima tiene una actividad proteolítica en un rango de pH de 3 a 8. Esta enzima se utiliza como ablandador de carnes a través del tiempo y se ha demostrado que estas se suavizan cuando entran en contacto con la enzima anteriormente descrita. (Begoña, Sánchez y González, 2016)

La dureza de la carne es un inconveniente en la comercialización y consumo, de allí que siempre se ha buscado alternativas para mejorar su textura que no sea cocción prolongada. Una de las alternativas es utilizar proteasas que se encuentran en la piña que tienen función semejante a la pepsina que ayuda a romper los enlaces peptídicos liberando aminoácidos que son más asimilables y que el organismo utiliza para la reparación, formación de tejidos y otras funciones orgánicas. (Fito *et al.*, 2014)

En Ecuador la gran producción de piña que es utilizada a gran escala en la industria alimenticia, generan una cantidad de residuos como la corteza y tallos, que podrían convertirse en materia orgánica para la producción de Bromelina. Es conocido que esta fruta contiene cantidades apreciables de esta enzima en la corteza, que se podrían utilizar para mejorar la textura de carnes debido a sus propiedades proteolíticas. Con los antecedentes mencionados, presento este trabajo de investigación, que tiene como propósito demostrar la acción proteolítica de la Bromelina presente en la corteza de *Anana comosus*. (Magallanes, Salcedo 2013)

CAPÍTULO I

I. JUSTIFICACIÓN

La terneza en la carne se ve afectada por varios elementos tales como: pH, temperatura y cantidad de enzimas presentes, lo que ayuda a la ruptura de los filamentos musculares que se contraen en la rigidez cadavérica (Garibay, Quintero y López, 2004).

Uno de los principales problemas de la carne es la dureza debido a que para la comercialización de carnes, se faenan animales de avanzadas edades; no todos los comercios pueden sacrificar animales jóvenes sino que por disponibilidad existen las vacas que han terminado su ciclo productivo y bordean edades entre 8 y 9 años o más, cuyo fin inmediato es el sacrificio para su posterior aprovechamiento. (Marrasquin Briones, 2016)

No obstante la terneza en la carne es una de las características más importantes para el consumidor, ya que es la cualidad de cortar y masticarse previo a su deglución. (Garibay, Quintero y López, 2004).

En este trabajo de investigación se busca una alternativa de origen natural, como la extracción de la Bromelina extraída de la corteza *Ananas comosus* (piña), ya que posee propiedades proteolíticas rompiendo los enlaces peptídicos ayudando a mejorar la calidad y disminución la dureza de la carne.

II. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿La enzima Bromelina obtenida de la corteza *Ananas comosus* (piña) tendrá actividad proteolítica sobre el extracto acuoso de carnes de bovinos?

III. HIPÓTESIS

La actividad proteolítica que presenta la enzima Bromelina obtenida de la corteza de *Ananas comosus* (piña) produce significativamente la ruptura de los enlaces peptídicos en el extracto acuoso de carne de bovino.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la actividad proteolítica de la enzima Bromelina en un extracto acuoso de carne de bovino.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la concentración de proteínas totales en el extracto acuoso de carne de bovino.
- Cuantificar la concentración de proteína totales obtenida en el extracto de la enzima Bromelina.
- Establecer el grado de actividad proteolítica de la enzima Bromelina en el extracto acuoso de carne de bovino.

V. VARIABLES DE LA INVESTIGACIÓN

VARIABLE DEPENDIENTE

- Acción proteolítica sobre la carne de bovino.

VARIABLES INDEPENDIENTES

- Concentración (mg/dl)
- Tiempo (minutos)
- Grado alcohólico (%)

VI. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Tabla I: Operacionalización de las variables: conceptualización e indicadores

TIPO	VARIABLES	CONCEPTUALIZACIÓN	INDICADORES
Dependiente	Acción proteolítica sobre la carne de bovino	Ruptura de enlaces péptidos presentes en las proteínas de la carne de bovino	g/dl
Independientes	Tiempo	Intervalos de 15, 30, 45,60 minutos	min
	Concentración	Concentraciones de la enzima de: 222,58; 395,82; 336,85	mg/dl
	Grado alcohólico	Concentraciones de 75, 90, 95	%

Elaborado por: Del Pezo (2018)

CAPÍTULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. ANTECEDENTES

Gautam *et al* (2010), mencionan que la Bromelina fue aislada de los tallos y los frutos de las plantas de piña madura por extracción con solución de buffer acuosa amortiguada. La purificación de la enzima se llevó a cabo por centrifugación, técnica de precipitación de sales, diálisis, cromatografía de intercambio iónico y la estimación por el método de Lowry, además, fue ensayada por su actividad mediante la hidrólisis de la gelatina, representado mediante el uso de unidad de digestión de gelatina. La homogeneidad de la Bromelina fue confirmada por el análisis SDS-PAGE (sodio dodecilsulfato- poliacrilamida por electroforesis en gel). Se encontró que la mejor actividad de la Bromelina de fruta. Por otra parte, la cromatografía de intercambio iónico con dietilaminoetil celulosa (DEAE), mantiene la integridad estructural de la Bromelina purificada y por lo tanto el producto exhibe una mejor actividad proteolítica.

En la investigación realizada por Hernández *et al.*, (2003), mencionan que la Bromelina es una proteasa aislada de órganos de plantas de piña con un amplio espectro de acciones farmacológicas y alimenticias. Diseñaron un procedimiento de extracción de Bromelina en el que utilizaron protectores del centro activo de la enzima a un pH cercano al fisiológico de la planta y alejado del óptimo. El perfeccionamiento de la tecnología demostró que se alcanzan rendimientos de 20,8 g de producto/kg de tallos y 3,9 g de proteínas/kg de tallos, con una actividad específica de 1,36 U/mg.

Por su parte Jiménez (2009) en su estudio determinaron que la Bromelina actúa con mayor especificidad en la proteína miosina que en la proteína actina dando mayor ablandamiento en las carnes deshidratadas por congelación.

Dalgo (2012) utilizando como sustratos proteínicos leche y extracto de carne y utilizando el viscosímetro de Cannon-Fenske determinaron la viscosidad al adicionar concentrados proteínicos de Bromelina, observando incremento de la viscosidad del complejo enzima-sustrato directamente proporcional al tiempo de exposición de la enzima.

Marrasquin (2016) determinó que la adición de la mezcla de las enzimas (Bromelina y papaína) obtuvieron un efecto de mejora en algunas de las características del corte de la carne bovina como: perfil de textura (dureza, masticabilidad, elasticidad y cohesividad), pH y la capacidad de retención del agua (CRA), estos últimos parámetros ayudan a alargar el tiempo de vida útil de la carne.

Montoya & Miano (2011) en su estudio de ablandamiento de carnes concluyen que para obtener carnes de calidad parecida al lomo fino de la res, se debe tratar a la carne con extracto de Bromelina 100% de corazón de piña y de 0 a 50 g/L de cloruro de sodio.

Clavijo, Portilla & Quijano (2012) en la extracción de Bromelina obtuvieron como resultado que, la acetona, a una concentración de 75% v/v, es la más eficaz para la extracción (243,2mg) que supera aproximadamente en 100mg a la cantidad obtenida con el etanol al 50% v/v (146,0mg), además, la caseína resultó ser un sustrato por el cual la Bromelina presenta gran afinidad enzima teniendo mejores resultados actuando a temperatura ambiente y pH 6.

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 Enzimas

Las enzimas son proteínas especializadas en la catálisis de las reacciones químicas que tienen lugar en la célula. Son muy eficaces como catalizadores ya que son capaces de aumentar la velocidad de las reacciones químicas hasta alcanzar un equilibrio, y además, son altamente específicos ya que cada uno de ellos induce la transformación de un sólo tipo de sustancia y no de otras que se

puedan encontrar en el medio de reacción. (De Lera Satín, 2011)

Las reacciones catalizadas por enzimas siguen esta ley general. Sin embargo, al ser proteínas, a partir de cierta temperatura, se empiezan a desnaturalizar por el calor. La temperatura a la cual la actividad catalítica es máxima se llama temperatura óptima. Por encima de esta temperatura, el aumento de velocidad de la reacción debido a la temperatura es contrarrestado por la pérdida de actividad catalítica debida a la desnaturalización térmica, y la actividad enzimática decrece rápidamente hasta anularse. (Villen – CONASI 2012)

2.1.1 Clasificación de las enzimas

Tabla II: Clasificación de las enzimas

Clasificación De Las Enzimas De Acuerdo A Su Acción Catalítica	
Oxidorreductasas	Catalizan reacciones de óxido – reducción, es decir, transferencia de hidrogeno (H) o electrones (e-) de un sustrato a otro.
Transferasas	Catalizan la transferencia de un grupo químico (distinto del hidrógeno) de un sustrato a otro.
Hidrolasas	Catalizan las reacciones de hidrólisis.
Liasas	Catalizan reacciones de ruptura o soldadura de sustratos.
Isomerasas	Catalizan la interconversión de isómeros.
Ligasas	Catalizan la unión de dos sustratos con hidrólisis simultánea de un nucleótido trifosfato.

Fuente: González Mañas Juan (2013)

2.2 Enzima Bromelina

2.2.1 Descripción

Es una enzima con acción proteolítica inicialmente encontrada en las hojas y en el tallo de la planta de *Ananas comosus*. Posteriormente se constató su presencia en el fruto de la misma planta y en otras especies pertenecientes a la Familia Bromeliaceae. (López, Díaz y Merino, 2009)

La enzima purificada del fruto es una cisteína proteasa de carácter ácido, perteneciente a la misma familia que la papaína, extraída de la papaya. Se trata de una glicoproteína, aparentemente homogénea, que hidroliza enlaces peptídicos, la cual se encuentra conformada por un residuo amino terminal, la valina y su carboxilo terminal, la glicina, cuya composición química queda reflejada en la Tabla III. (Marrasquin, 2016)

2.2.2 Características de la Bromelina

La Bromelina es una enzima que cataliza la hidrólisis de los enlaces peptídico de la carne de ganado bovino, actúa sobre otras proteínas como la caseína, la hemoglobina y la gelatina. El pH óptimo de actuación de la enzima sobre la caseína y la hemoglobina desnaturalizada es, respectivamente, de 8.3 y 8.0. (Errasti, 2013)

La acción de la Bromelina se produce precisamente en el estómago y el intestino. Su propiedad más conocida es su capacidad de digerir proteínas de los alimentos, contribuyendo a facilitar este proceso al estómago y al páncreas. (Errasti, 2013)

La enzima se inhiben por derivados mercuriales como el p-CMB (Acido p-cloromercuribenzoico) lo que demuestra que los grupos –SH reactivos son necesarios para la actividad. El agente nucleofílico es el átomo de azufre de la cisteína que formaría un intermediario covalente durante la reacción. (López, et al., 2009)

2.2.3 Composición química de la Bromelina del fruto

Tabla III: Composición química de la Bromelina del fruto

AMINOÁCIDO (1)	FRUTA VERDE	FRUTA MADURA
Ác. Aspártico	29.8	29.8
Ác. Glutámico	23.2	23.4
Glicina	32.6	32.2
Alanina	23.8	24.4
Valina	19.8	20.1
Leucina	10	10
Isoleucina	16.4	16.2
Serina	32.2	32
Treonina	13.5	13.8
Cisteína	10	10
Metionina	6	5.8
Prolina	11.6	12
Fenilalanina	7.6	8
Tirosina	22.4	22.2
Triptófano	5.6	---
Histidina	1.4	1.3
Lisina	7.8	8.3
Arginina	8.6	9.1
Amonio amida	43	43.4
Glucosamina	0.2	0.2
Carbohidratos (%)	3.2	3.3

Fuente: López, et al. , 2009

(1) Num. de Residuos calculados por molécula de 35.7 Kda (kilo Dalton), tomando como referencia un valor de 10 para la Leucina.

Tabla IV: Distribución de la Bromelina en la piña, var. “Cayena Lisa”

PARTE DE LA PLANTA	BROMELINA (1)	ACTIVIDAD (2)
TALLO		
Parte Baja	0.25	138
Parte Alta	0.16	1309
Tallo Verde	0.14	51.44
HOJAS	0.11	84.33
FRUTO VERDE		
Corona	0.14	235.6
Piel	0.17	346.4
Pulpa	0.08	449.8
FRUTO MADURO		
Corona	0.04	137.3
Piel	0.18	278.3
Pulpa	0.13	336.9

Fuente: López, et al. , 2009

(1) Expresada en gramos de Bromelina por 100 gramos de peso fresco.

(2) Unidades proteolíticas por gramo de peso fresco (medida sobre la digestión de la caseína)

2.2.4 Propiedades químicas

El extracto acuoso crudo del tallo y el fruto de la piña es una mezcla de diferentes tiol endopeptidasas y otros componentes como fosfatasas, glucosidasa, peroxidasa, celulasas, glicoproteínas, carbohidratos y varios inhibidores de la proteasa. La bromelina del tallo es diferente de la del fruto cuyas actividades enzimáticas comprenden un amplio espectro con un rango de pH de 5.5-8.0, con diferentes sustratos tales como caseína, gelatina y tripéptidos cromogénicos. (Pavan et al., 2012).

2.2.5 Propiedades físicas

Las características físicas de Bromelina se describen en la Tabla V.

Tabla V: Propiedades físicas de la Bromelina

ORIGEN	TALLO DE PIÑA
Peso molecular	33000 Da
Olor y sabor	Característico
Solubilidad	En agua
pH óptimo	7
Actividad enzimática	1200 GDU/gr [7]
Temperatura de inactivación	70° C
Temperatura de almacenamiento	25° C

GDU (unidades de disolución de gelatina)

Fuente: Pulido, 2007

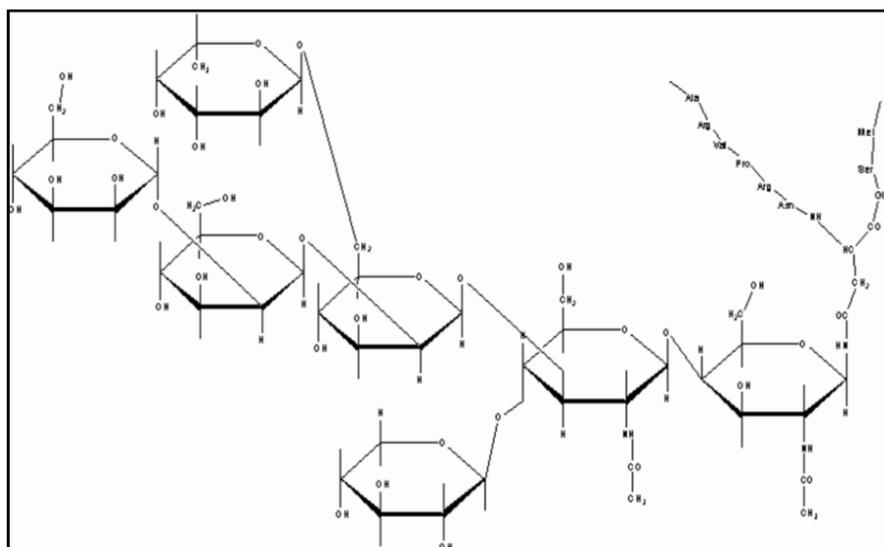


Figura 1 Estructura de la Bromelina

Fuente: Pulido. (2007)

2.2.6 Usos

En la industria de alimentos, su mayor aplicación es en el macerado o ablandado de la carne, aclaramiento de la cerveza, productos de proteínas solubilizadas e hidrolizadas y fabricación de quesos, vinos, etc. (Pulido, 2007)

En la industria farmacéutica, resulta muy adecuada como activo en medicamentos para la circulación, debido a que este componente disuelve los

coágulos que puedan formarse y fluidifica la sangre. Esto es una buena manera de evitar problemas circulatorios como trombosis, ataques cardíacos, apoplejías y al mismo tiempo disminuir la presión sanguínea elevada o hipertensión. Esta capacidad para digerir las proteínas puede utilizarse para eliminar microorganismos y parásitos en el interior del cuerpo. (Pulido, 2007)

En la industria de curtiduría, se utiliza como suavizante de pieles y curtidos, puesto que modifica la permeabilidad de las pieles y las hace más suaves. Los residuos de los tallos de piña, como producto derivado del procesamiento para la Bromelina, pueden ser usados como aditivo en alimentos animales y medio de cultivo para plantas tales como orquídeas, té, etc. La producción industrial de la Bromelina, se considera una especialidad. (Pulido, 2007).

2.3 Familia Bromeliaceae

2.3.1 Generalidades de la Familia Bromeliaceae

La familia Bromeliaceae está constituida por casi 3700 especies incluidas en 57 géneros. Tradicionalmente la familia ha sido subdividida en tres subfamilias: Pitcairnioideae, Tillandsioideae y Bromelioideae. La subfamilia Pitcairnioideae incluye a las bromeliáceas más ancestrales y muchas de sus especies recuerdan a la familia de las gramíneas (Poaceae), de la cual evolucionaron. (Errasti, 2013)

La mayoría son terrestres contando con un sistema extenso de raíz. La subfamilia Tillandsioideae, formada mayoritariamente por especies epífitas, se ha adaptado para sobrevivir en condiciones muy secas; las semillas tienen alas, lo que las hace susceptibles de ser dispersadas por el viento, y apéndices plumosos que les permite adherirse sobre superficies rugosas. (Errasti, 2013)

Bromelioideae es la subfamilia más diversa. La mayoría de sus especies también son epífitas, aunque algunas se han adaptado a las condiciones terrestres. Están compuestas de un arreglo foliar espiralado denominado “roseta”, donde las bases foliares se superponen parcialmente y pueden funcionar como un reservorio hídrico. Generalmente tienen hojas espinosas y sus semillas son a

menudo distribuidas por los pájaros y animales, que consumen sus frutos carnosos. (Errasti, 2013)

2.4 Piña

2.4.1 Descripción

Ananas comosus, la piña tropical o el ananá o ananás o matzatlí, es una planta perenne de la familia de las bromeliáceas, nativa de América del Sur. Esta especie, de escaso porte y con hojas duras y lanceoladas desde la cola hasta 1 metro de largo, fructifica una vez cada tres años produciendo un único fruto fragante y dulce, muy apreciado en gastronomía. (CONABIO, 2009)

2.4.2 Características de la piña

La piña es el segundo cultivo tropical de importancia mundial después del banano, aportando más del 20% del volumen mundial de frutos tropicales. Setenta por ciento de la piña producida en el mundo es consumida como fruta fresca por el país que la produce. Procedente de la familia de las Bromeliáceas, su origen se remonta en forma muy primitiva en Brasil y Paraguay. Todas estas especies son nativas de la cuenca amazónica. Se ha señalado como el área de origen entre Brasil, Paraguay y Argentina, las selvas de las amazonas, Venezuela y Guyanas. (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2010)

2.4.3 Variedades de piñas

2.4.3.1 Cayena lisa

Cultivar más sembrado a nivel mundial (elaboración de rodajas). Fruto ovoide de tamaño mediano (1,5-2,5 kg). Pulpa amarilla pálida, blanda con contenido variable de azúcares (de 13 a 19º brix) y acidez, dependiendo del clima. Jugo de baja calidad por su pobre color, alto contenido de azúcares y turbidez. Hojas con espinas pequeñas en su base y ápice. Produce pocos hijos. Susceptible

a perforadores de frutos, nematodos y Fusarium. Tolerante a Phytophthora sp. (Parra, 2018)

2.4.3.2 Panare

Planta de hojas largas, de color verde rojizo, con espinas cortas. Fruto pequeño (0,45 – 0,70 kg) de forma ovalada con cuello de botella; color externo anaranjado. Ojos hexagonales prominentes, profundos con brácteas mucho más largas que los ojos. Pulpa amarilla, con 10° – 14° brix, de textura suave con poca fibra y poco aroma. Produce de 2 a 4 hijos. (Parra, 2018)

2.4.3.3 Española roja

También conocida con los nombres de 'Black Spanish', 'Key Largo', 'Cubana', 'Cumanesa'. Este cultivar o variedad ha sido ampliamente cultivado en Venezuela y el Caribe. Su fruto es de tamaño mediano (1,2-2 kg), epicarpio (piel) color naranja, y con forma de barril. Pulpa firme, pálida, aromática y dulce, con moderado contenido de azúcares ($\pm 12^{\circ}$ brix) y baja acidez. Planta con hojas espinosas o medianamente espinosas. Produce de 1 a 3 hijos. Tolerante a altas temperaturas, sequía y Phytophthora sp., pero no a nemátodos. (Parra, 2018).

2.4.3.4 Perola

Principal cultivar en Brasil para mercado fresco. Fruto de pequeño a mediano (0,9- 1,6 kg), de forma ovoide (cuando pequeño) a cónico, de color verde con un poco de amarillo en el centro de los ojos maduros. Pulpa blanda, blanca y jugosa, de exquisito aroma y contenido de azúcares (13-16° brix). Planta robusta, erecta con hojas espinosas. Resistente a Phytophthora y tolerante a sequía y nemátodos. Susceptible a Fusarium (Parra, 2018)

2.4.3.5 Perolera

Cultivar importante en los Andes de Venezuela y Colombia. Otros

nombres: 'Tachirense', 'Capachera', 'Motilona', 'Lébrija'. Fruto grande (1,5 a 3 kg), de color amarillo a anaranjado, con forma de cilindro irregular que se desarrolla en un largo pedúnculo (tendencia a caerse y por tanto se observan con frecuencia quemaduras por el sol). Pulpa de amarillo pálido a amarillo, firme y dulce ($\pm 12^\circ$ brix). Produce de 4 a 11 hijos. Hojas lisas por poseer piping. Resistente a Fusarium. (Parra, 2018).

2.4.3.6 Burmanguesa

Tal vez sea una mutación de "Perolera" fruto de color externo rojo a morado, color interno amarillo intenso y ojos poco profundos. (Parra, 2018).

2.5 Proteínas

2.5.1 Descripción

Las proteínas son macromoléculas formadas por una secuencia de moléculas más pequeñas que se llaman aminoácidos. Cuando comemos un alimento que contiene proteínas, nuestro organismo las descompone y las despedaza en aminoácidos con los que luego elabora sus propias proteínas según sus necesidades. Por ejemplo, algunas de las moléculas más importantes de nuestro organismo como las enzimas, hormonas, anticuerpos, etc., son proteínas que nuestro cuerpo ha elaborado a partir de esos aminoácidos. En otras palabras, estos aminoácidos son los "ladrillos" que nuestro organismo utiliza para construir de acuerdo a diferentes finalidades. Aunque algunos de ellos podemos sintetizarlos de manera endógena, pero 10 de los aminoácidos que necesitamos debemos ingerirlos a través de la alimentación porque nuestro cuerpo no puede fabricarlos. Estos son los llamados aminoácidos esenciales. (ESPN 2018)

2.5.2 Digestión de las proteínas

Las proteínas no pueden ser utilizadas tal y como se presentan en los alimentos que se ingieren ya que, sin un proceso metabólico, se expulsarían tal

como entran. Para poder aprovecharlas como nutrientes y disponer de los aminoácidos que el organismo necesita para construir sus propias proteínas, el sistema digestivo ha de realizar complicados procesos que descompongan las proteínas y los aminoácidos sean aprovechados en forma correcta. (Carvajal, 2013)

El primer paso para descomponer las proteínas ingeridas con los alimentos se produce en el estómago, gracias a una enzima llamada pepsina. Para trabajar de manera eficaz, esta enzima necesita un entorno muy ácido. Este entorno ácido se consigue gracias a unas glándulas gástricas que secretan ácido clorhídrico, que acidifica el jugo gástrico permitiendo así la descomposición de las proteínas. (Carvajal, 2013)

2.5.3 Absorción de los aminoácidos

En el intestino delgado, las proteínas ya en forma de aminoácidos son absorbidas por las vellosidades intestinales para llegar hasta los capilares sanguíneos. A través del sistema circulatorio, estos aminoácidos llegarán a las células que los necesitan para fabricar los distintos tipos de proteínas específicas de nuestro organismo. Cuando no masticamos bien o cuando ingerimos trozos de alimentos demasiado grandes para que las enzimas y los jugos puedan desmenuzarlas, estas proteínas no pueden ser metabolizadas ni utilizadas y seguirán su transcurso por el intestino grueso y el ano hasta ser expulsadas en las heces. (León, 2004)

2.5.4 Proteínas de origen animal

Cuando se dice que las proteínas de origen animal tienen un alto valor biológico, quiere decir que las proteínas animales (que tienen un ADN más similar al nuestro que los vegetales) contienen una cantidad de aminoácidos muy parecida a la que nuestro organismo necesita para construir sus propias proteínas. (ESPN 2018)

Es decir, el organismo necesita una serie de aminoácidos para construir sus proteínas endógenas. Pues bien, las proteínas contenidas en la carne animal contienen todos los aminoácidos necesarios y en las cantidades acertadas. Esto no quiere decir que esos mismos aminoácidos no los podamos encontrar en el reino vegetal y en las cantidades necesarias. Lo que quiere decir es que, para poder utilizar proteína vegetal de una manera óptima, es necesario conocer bien los alimentos que las contienen y saber combinarlos adecuadamente, mientras que comer carne es una forma más rápida y práctica de conseguir la misma finalidad. (ESPN 2018)

2.6 Carne

La carne son tejidos animales que sirven como alimento, se deben obtener en condiciones higiénicas. Los tejidos que se incluyen son el muscular (es el principal), conectivo, cartilaginoso, adiposo e incluso en algunos casos la piel. Los animales de abastos principales son mamíferos (ovino, bovino, porcino, conejos) le siguen las aves (pollo, ganso, pavo), también se incluyen los animales de caza tanto mamíferos como aves, y también se extiende el concepto de animal de abastos a las avestruces y otras especies exóticas como la serpiente o el lagarto. (Aguilar et al., 2012)



Figura 2. Carne
Fuente: Aguilar et al., (2012)

2.6.1 Composición química:

2.6.1.1 Agua

La cantidad varía dependiendo de la especie, la edad, sexo y zona anatómica del tejido. La variación de la cantidad de agua está directamente relacionada con la variación de la cantidad de grasa (lo mismo pasa en todos los alimentos). La cantidad de agua en la carne oscila entre 60 y el 80% y está relacionada con la jugosidad y otros atributos sensoriales como la textura el color o la dureza de la carne. (Aguilar et al., 2012)

2.6.1.2 Proteínas

Proteínas miofibrilares: Van a suponer hasta el 65-75% del total de las proteínas del músculo. Las más importantes van a ser la actina (principal componente de los filamentos delgados) y la miosina (principal componente de los elementos gruesos). La forma en la que nos las vamos a encontrar en la carne es en forma de actino- miosina. (Aguilar et al., 2012)

Miosina: Supone el 50% aproximadamente de las proteínas miofibrilares. La molécula está compuesta por dos cadenas pesadas (meromiosina) y cuatro cadenas ligeras. Las dos cadenas pesadas forman la cola y tienen una estructura fibrilar, mientras que las cadenas ligeras forma la cabeza y tienen estructura globular. Las cadenas ligeras tienen un centro activo ATPasa. Las cabezas son las que se van a unir y separar rápidamente a la actina. El punto isoeléctrico de la miosina es de 5,3. (Aguilar et al., 2012)

Actina: Es la parte fundamental de los filamentos de delgados, es una proteína globular (tiene mucha prolina) que se denomina actina G. es capaz de polimerizarse para formar filamentos que se denominan actina F.2 filamentos de actina F enrollados es la base de los filamentos delgados. Supone el 25% de las proteínas miofibrilares y su punto isoeléctrico está en torno a 4,7 (es el punto de pH en el que la proteína presenta carga neutra lo cual es muy importante en cuanto a la capacidad de retención de agua de la carne). (Aguilar et al., 2012)

Proteínas sarcoplásmicas: Suponen alrededor del 30-35% del total de proteínas, se encuentran en el citoplasma de la fibra muscular. (Aguilar et al., 2012)

Tabla VI Distribución de las proteínas en el tejido muscular

TIPO DE PROTEÍNA	BASE HÚMEDA	BASE SECA
Contráctiles o miofibrilares		
Miosina	5.0 %	25.0 %
Actina	2.5 %	12.5 %
Tropomiosina	0.8 %	4.0 %
Troponina	0.8 %	4.0 %
Actinina	0.3 %	1.5 %
Otras	0.6 %	3.0 %
Total	10 %	50 %
Sarcoplásmicas o solubles		
Enzimas	6.0 %	30.0 %
Mioglobina	0.6 %	3.0 %
Otras	0.4 %	2.0 %
Total	7.0 %	35.0 %

Fuente: (Aguilar et al., 2012)

2.6.1.3 Grasas.

El contenido en la carne va a ser muy variable siendo el parámetro que más varía. Tal cantidad de grasa va a depender de la relación grasa-agua. Todo lo que hay en el agua, proteínas, sales etc. variará si aumenta o disminuye la cantidad de grasa. Esta grasa se va a acumular en cuatro depósitos: cavidad torácica, abdominal y pélvica.

- Zona subcutánea.
- Localización intramuscular
- Localización intermuscular.

La grasa de estos depósitos va a ser una grasa neutra. Formada por triglicéridos principalmente. Además, también hay diacilglicéridos y monoacilglicéridos. Los triglicéridos son moléculas de glicina unidas por enlaces ésteres a tres ácidos grasos. También habrá colesterol y ésteres de colesterol. (Aguilar et al., 2012)

Dependiendo de la especie el porcentaje de grasa variará siendo en el cordero de un 6,6% y en el cerdo de un 5,25%. El porcentaje de grasa en la vaca, pollo, conejo, pavo está entre 2-3,2%. La cantidad de lípidos neutros será de 6,1% del cordero y del 4,9% en el cerdo. En la vaca, pollo, conejo y pavo es inferior al 3%. (Aguilar et al., 2012)

Factores que influyen en la cantidad y composición de la grasa.

El principal factor es el tipo de especie. Dentro de ella influirá la raza, la edad y el sexo. Mayor cantidad de grasa habrá en las hembras y al castrar a los machos se consiguen que tengan más grasa. Dentro de los factores extrínsecos influye la alimentación. En los monogástricos como el cerdo, dependiendo de la cantidad de grasa que consume esa será la que va a tener ya que no la transforma en su estómago. Sin embargo los rumiantes, la grasa se satura en el estómago, por ello va a ser una grasa más saturada que la de los cerdos o de las aves. (Aguilar et al., 2012)

2.6.1.4 Carbohidratos.

La cantidad apenas llega al 1% en la carne siendo el más importante el glucógeno. El glucógeno es un polímero de alfa-D-glucosa con enlaces (alfa1-4) y (alfa 1-6). Es la fuente de energía del músculo siendo parte del glucógeno consumido en el rigor mortis. (Aguilar et al., 2012)

Análisis químico aproximado de la mayoría de las carnes

Tabla VII Análisis químico aproximado de la mayoría de las carnes

Componentes	Cantidad
Agua	70.0 g
Proteínas	20.0 g
Grasa	6.0 g
Sustancias inorgánicas no proteínicas	1.5 g
Hidratos de carbono y sustancias no Nitrogenadas	1.5 g
Sales inorgánicas	0.7 g

Fuente: Aguilar et al. , 2012

2.6.2 Valor nutritivo de la carne

2.6.2.1 Proteínas

Cuantitativamente la carne aporta muchas proteínas. Dentro de estas las más importantes serán las miofibrilares. La carne es capaz de aportar en 100 g más del 50% de la cantidad diaria recomendada de proteína. Además, van a ser proteínas de un alto valor biológico lo cual dependerá de la calidad en sí de la proteína, así como de su digestibilidad. La carne va a aportar de manera equilibrada aminoácidos esenciales (fenilalanina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptófano y valina). (Aguilar et al., 2012)

2.6.2.2 Grasa

Es el componente que más varía. La carne aporta mucha energía en forma de grasa siendo el lípido principal los triglicéridos. Cualitativamente la grasa de la carne se considera saturada. Está implicada en las enfermedades cardiovasculares y desde el punto de vista científico a la hora del tratamiento culinario, la carne de cerdo pierde gran cantidad de grasa. (Aguilar et al., 2012)

2.6.2.3 Minerales

La cantidad de minerales que aporta la carne es elevada a excepción de algunos elementos como el calcio. El hierro es muy abundante en la carne, así como en el hígado y bazo. Además, este aporte se hace de forma orgánica por lo que es fácilmente asimilable. Es una fuente muy buena de vitaminas del grupo B. (Aguilar et al., 2012)

Composición nutricional de las carnes

Tabla VIII: Composición nutricional de las carnes por 100g

Producto	Agua	Prot.	Grasas	Cenizas	kJ*
Carne de vacuno (magra)	75.0	22.3	1.8	1.2	485
Canal de vacuno	54.7	16.5	28.0	0.8	1351
Carne de cerdo (magra)	75.1	22.8	1.2	1.0	469
Canal de cerdo	41.1	11.2	47.0	0.6	1975
Carne de ternera (magra)	76.4	21.3	0.8	1.2	410
Carne de pollo	75.0	22.8	0.9	1.2	439
Carne de venado (ciervo)	75.7	21.4	1.3	1.2	431
Grasa de vaca (sub cutánea)	4.0	1.5	94.0	0.1	3573
Grasa de cerdo (tocino dorsal)	7.7	2.9	88.7	0.7	3397

Fuente: FAO (2014)

2.6.3 Textura de la carne

La textura de la carne se percibe como un conjunto de sensaciones táctiles resultado de la interacción de los sentidos con las propiedades físicas y químicas de la carne. Entre ellas se incluyen la densidad, la dureza, la plasticidad, la elasticidad, la consistencia, la cantidad de grasa, la humedad y el tamaño de las partículas de la carne. De todas ellas, la dureza es uno de los primeros criterios determinantes de la calidad de la carne para el consumidor (Horcada & Polvillo, 2010)

2.6.4 Dureza de la carne

La dureza se puede definir como la capacidad de la carne para dejarse cortar y masticar. A ella contribuyen principalmente tres tipos de proteínas musculares: las del tejido conjuntivo (colágeno, elastina y reticulina), las miofibrilares (actina y miosina) y las sarcoplásmicas. Otros componentes como son el contenido de grasa de infiltración, la estructura del tejido conjuntivo, el tamaño de los haces musculares, el estado de rigidez y la capacidad de retención de agua también afectan a la dureza de la carne. De entre ellas, la naturaleza y el contenido de colágeno son los factores que contribuyen en mayor medida a la dureza de la carne. (Horcada & Polvillo, 2010)

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 METODOLOGÍA

3.1.1 Tipo de investigación

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas (CC.QQ.) de la Universidad de Guayaquil (UG) y se utilizó metodología descriptiva, explicativa, hipotética, cuantitativa. En el presente capítulo se describe la metodología usada para la extracción, determinación de proteína e hidrólisis de la proteína de la Bromelina sobre el extracto acuoso de carne; así mismo se describe el diagrama de flujo de cada una de las operaciones realizadas y los materiales utilizados en la investigación.

Descriptiva: las *Ananas comosus* (piña), seleccionadas para este estudio, estaban en estado de madurez fisiológica y madurez de consumo; y la carne de bovino estaba fresca.

Explicativa: Explica la descripción de conceptos dirigidos a aclarar conceptos fundamentales y procedimientos relacionados al tema de estudio.

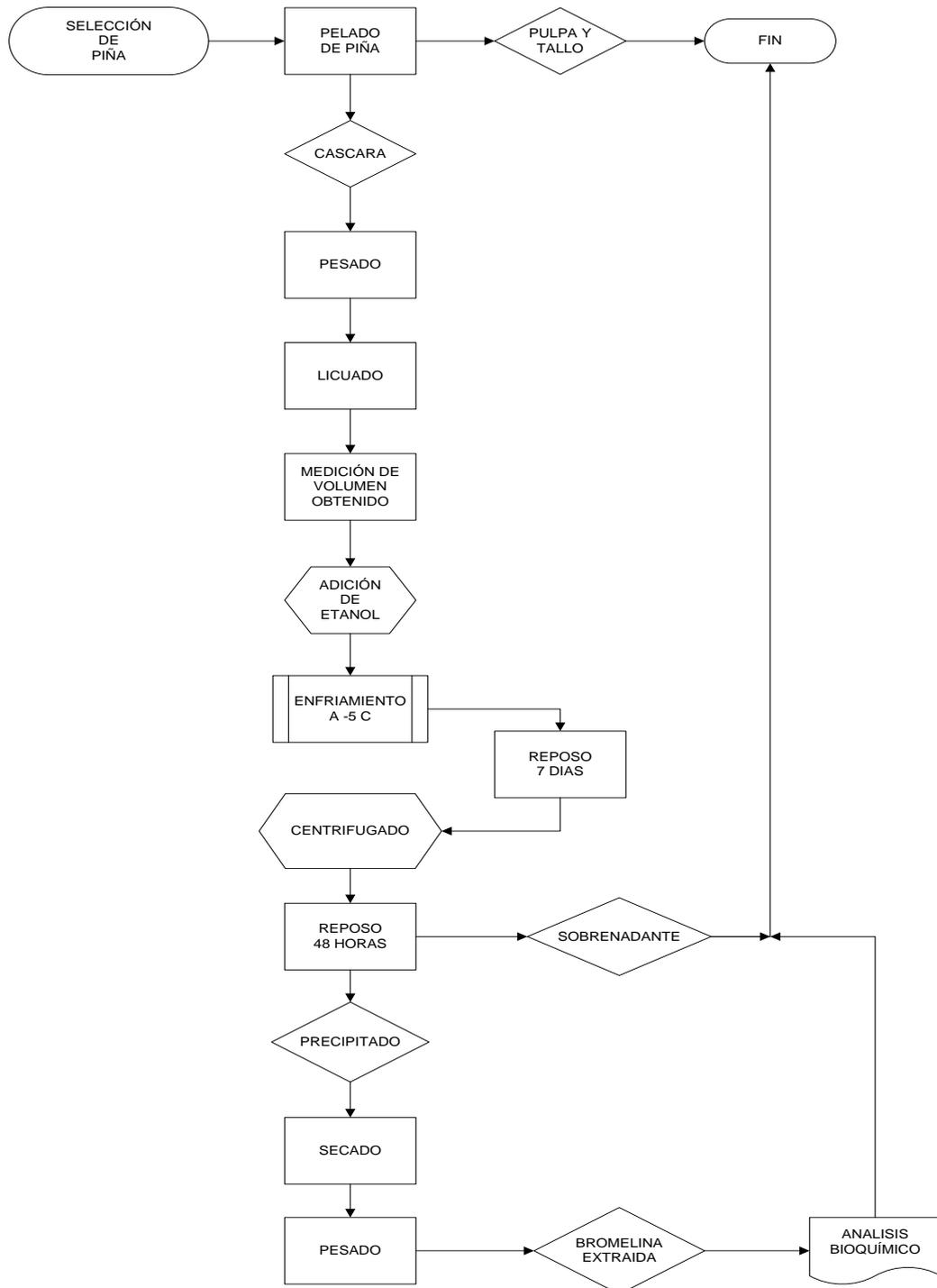
Hipotético: Porque plantea la hipótesis de la actividad proteolítica de la enzima Bromelina sobre el extracto acuoso de carne de bovino.

Cuantitativo: Se basa en la medición de la concentración de proteínas totales en la enzima Bromelina; en el extracto acuoso de carne y en la cuantificación de la actividad proteolítica de la enzima Bromelina, sobre el extracto acuoso de carne de bovino.

3.1.2 Metodología experimental

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Diagrama I: Obtención de Bromelina



Elaborado por: Del Pezo (2018)

3.2.1 Obtención de Bromelina por precipitación alcohólica.

3.2.1.1 Selección de piña

La materia prima seleccionada para el proceso de obtención de Bromelina fue *Ananas comosus* (piña) de variedad Perolera originaria de la ciudad de Milagro, Provincia del Guayas, en estado de maduración verde (pintón); se procedió a lavar su corteza con agua potable para la eliminación de impurezas, entre otros presentes en la corteza, posteriormente se lavó con agua destilada

3.2.1.2 Pelado y pesado de la corteza de piña

Las piñas seleccionadas fueron peladas a mano con cuchillos domésticos, separando la corteza, el tallo y la pulpa, posteriormente se procedió a pesar la corteza de la piña, obteniendo un peso de 226.78 gramos, para lo cual se utilizó una balanza marca Scout Pro misma que está ubicada en el laboratorio de Bioquímica de la Facultad de CCQQ.

3.2.1.3 Licuado de la corteza de piña

Para el licuado se procedió a dividir la corteza de piña en dos partes, mismas que previo al licuado se las cortaron en cuadros medianos, para facilitar la trituration. Se colocó la primera parte en la licuadora y se comenzó a licuar a velocidad alta, una vez que la cáscara estuvo completamente triturada se añadió la segunda parte, lo cual da lugar a una trituration homogénea de la cáscara de piña. La licuadora utilizada para este proceso fue una de marca Osterizer año 2015.

3.2.1.4 Medición del volumen obtenido de la corteza licuada

Una vez obtenida la corteza licuada de una forma homogénea se midió el volumen en una probeta, dando como resultado 100 ml.

3.2.1.5 Adición de Etanol

Se adicionó a la corteza de piña licuada, Etanol de 95%, en relación de 1.5 en 1 (150ml). La disolución se realizó en un vaso de precipitación de capacidad de 250 ml.

3.2.1.6 Enfriamiento/reposo

Después de añadir el Etanol de 95 %, se homogenizó la suspensión y se llevó a enfriamiento a -5 °C en un periodo de 7 días, en una refrigeradora marca Durex, que se encuentra en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de CCQQ.

3.2.1.7 Centrifugación

Transcurrido los 7 días de refrigeración, se retiró la muestra de la nevera y se la dejó hasta que alcance temperatura ambiente. Luego se procedió a centrifugar a 4500 rpm durante 25 minutos, utilizando una centrifuga marca Fanem. Una vez concluido el proceso de centrifugación se colocaron los tubos de ensayos en una gradilla y fueron llevados a refrigeración y se los dejó en reposo durante 72 horas a temperatura de 8 a 10 °C; una vez concluido el tiempo de reposo se retira la gradilla de la nevera y se deja que alcance temperatura ambiente, para luego realizar una segunda centrifugación a 4500 rpm durante 20 minutos, descartándose el líquido sobrenadante.

3.2.1.8 Precipitado proteínico obtenido

El precipitado obtenido de los tubos se los colocó en un vidrio reloj previamente pesado y se volvió a pesar para obtener los g de precipitado. La balanza utilizada es digital marca Scout Pro. Se obtuvo 5,3 g, este precipitado se dejó secar a temperatura ambiente por 72 horas, se volvió a pesar obteniéndose 2,18 g; el mismo procedimiento se aplicó para la obtención de Bromelina utilizando etanol de 90 % y 75 % , obteniendo 2,90 g y 2,08 g respectivamente.

El precipitado proteico de Bromelina se lo reconstituyó en 10 ml de agua destilada.

3.3 Cuantificación de proteínas totales.

Para determinar la concentración de proteínas se hicieron las curvas estándar respectivas.

3.3.1 Curva estándar por el método de Biuret

Fundamento: En medio alcalino regulado, los enlaces peptídicos de las proteínas reaccionan con los iones cúpricos del reactivo, dando un complejo de color azul-violáceo cuya intensidad medida fotométricamente a 540 nm, es proporcional a la concentración de proteínas totales de la muestra.

Para la curva estándar para proteínas por el método de Biuret se utilizó el estándar de Albumina Sérica Bovina (BSA) de concentración 5,5 g/dl.

Procedimiento

Previo al lavado y secado de los tubos de ensayos, se midió lo siguiente.

Tubos	1	2	3	4	5	6	Volumen
BSA	20	50	100	150	200	0	ul
S. salina 0,9 %	980	950	900	850	800	1000	ul
Mezclar							
R. de Biuret	3	3	3	3	3	3	ml

Mezclar, reposo 10 minutos.

Leer las absorbancias a 540 nm frente al blanco

Cada concentración se hizo por duplicado.

Con las absorbancias y las concentraciones se construyó la curva estándar.

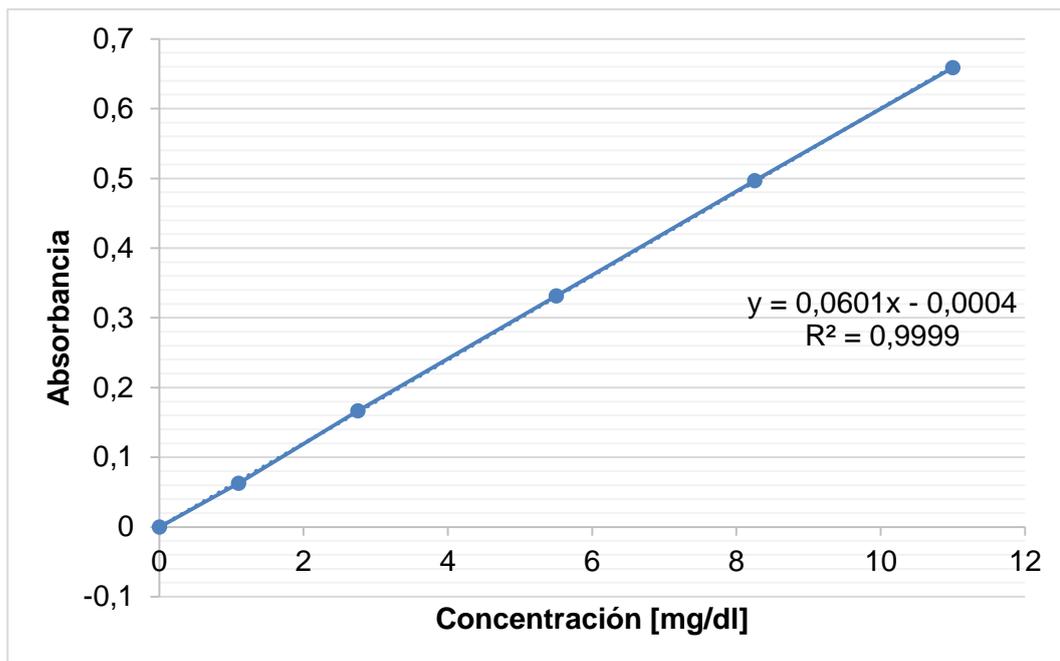


Gráfico I. Curva estándar de calibración para proteínas totales método de Biuret

3.3.2 Curva estándar para proteínas por el método de Lowry

Fundamento: El método de Lowry (1951) es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas; la intensidad de color es relativo dependiendo de la concentración de proteínas, de acuerdo a la ley de Lambert-Beer $A = \epsilon \cdot l \cdot c$. Este método está constituido por dos fases: 1) Los iones Cu^{2+} en medio alcalino, se adhieren a las proteínas constituyendo complejos con los átomos de Nitrógeno de las conexiones peptídicas. Estos complejos Cu^{2+} -proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el fraccionamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los restos fenólicos de Tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El Cu^{2+} permanece en solución alcalina en forma de su complejo con Tartrato. 2) La reducción, además en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu, por los grupos fenólicos de los restos de Tirosina, que se encuentran en la mayoría de las proteínas, interviniendo el cobre como catalizador. El primordial constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos forma un complejo de color azul intenso.

Procedimiento

Para la curva estándar para proteínas por el método de Lowry, se utilizó el estándar de Albumina Sérica Bovina (BSA) de concentración 50 mg/dl.

Tubos	1	2	3	4	5	6	volumen
BSA	100	200	300	400	500	0	UI
H2O(D)	400	300	200	100	0	500	UI
R. Lowry	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	ml
Mezclar, reposo a temperatura ambiente 10 minutos							
R. Folin	250	250	250	250	20	250	UI
Mezclar, reposo a temperatura ambiente 30 minutos. Leer las absorbancias a 700 nm frente al blanco							
Con las absorbancias obtenidas y la concentración de cada dilución se construyó la curva estándar.							

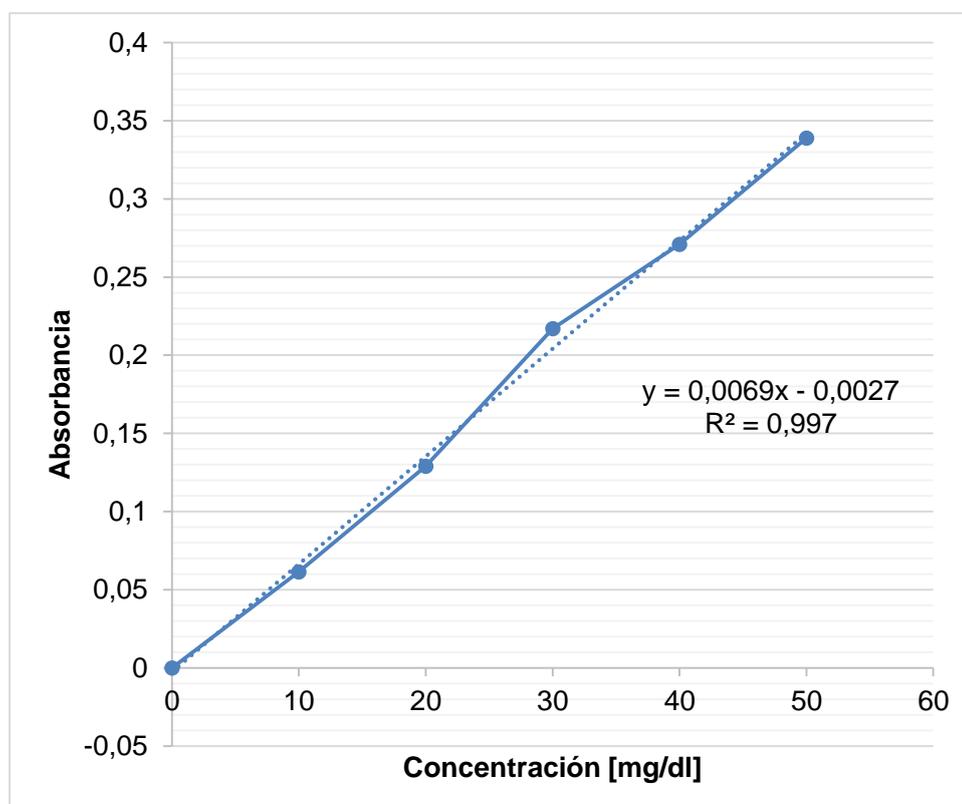
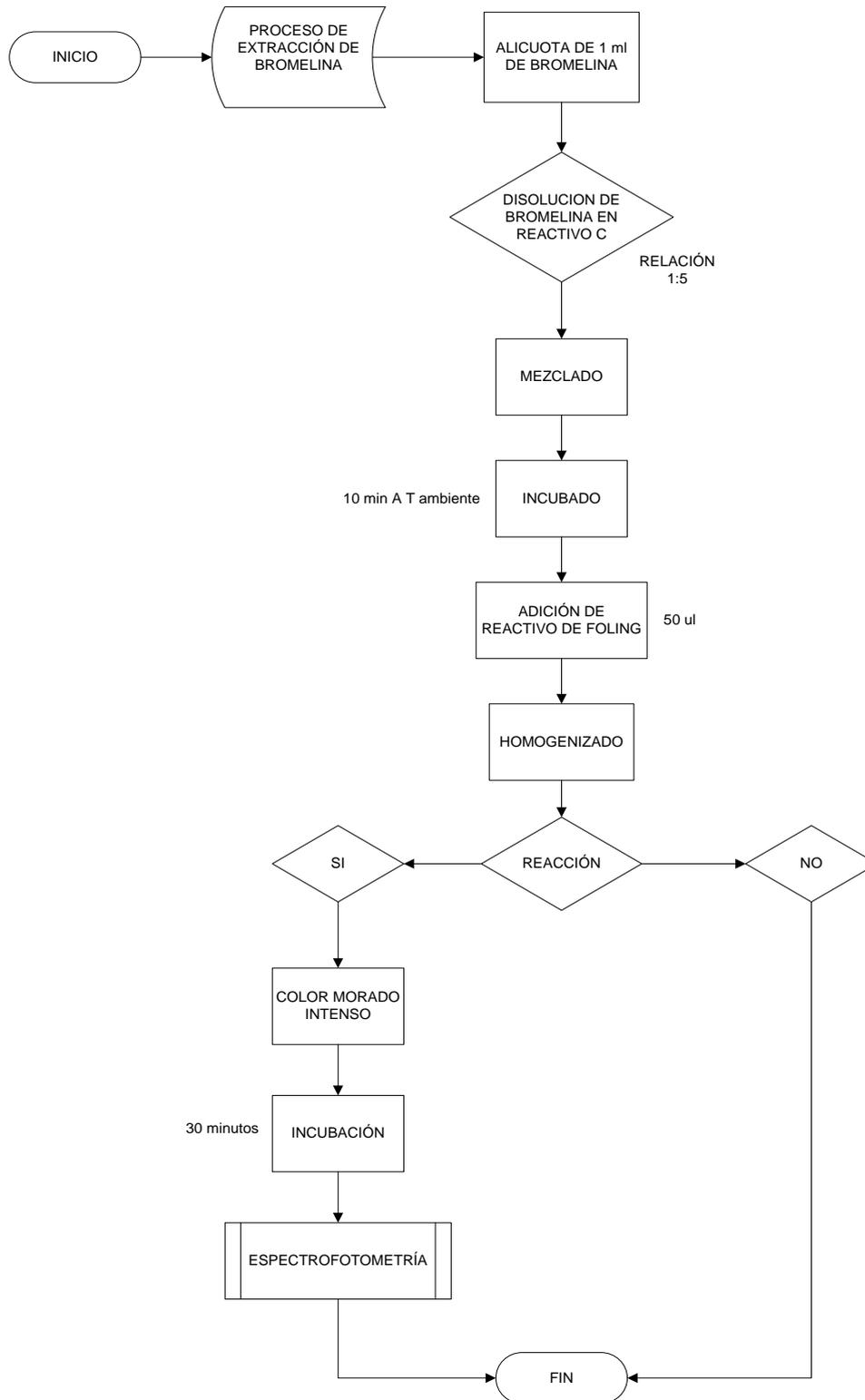


Gráfico II: Curva estándar de calibración para proteínas totales método de Lowry

Diagrama II: Determinación de proteína en Bromelina



Elaborado por: Del Pezo (2018)

3.3 Procedimiento para la determinación de proteínas en la Bromelina obtenida por el método de Lowry.

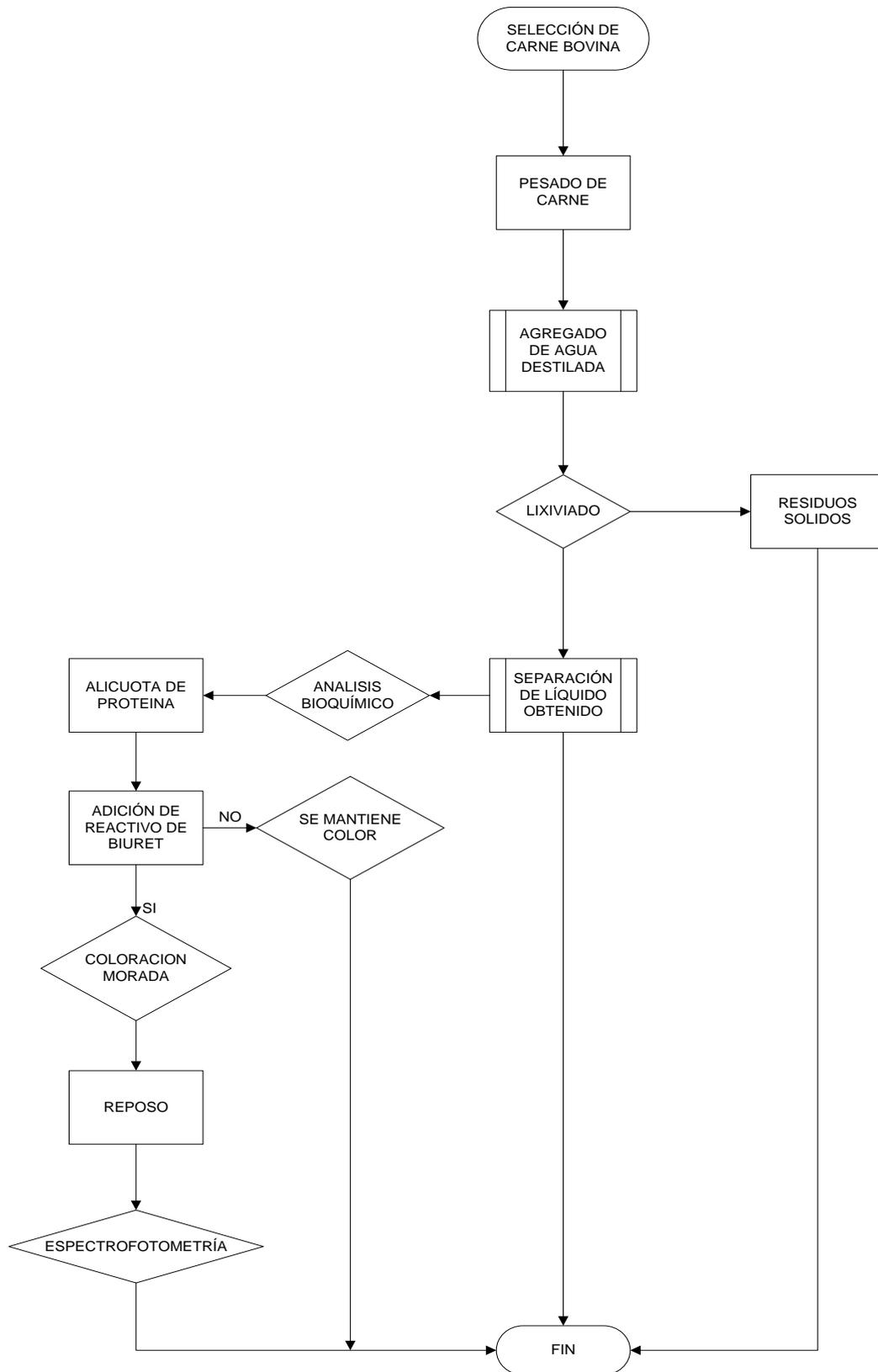
Se midió en un tubo de ensayo 0,5 ml de Bromelina en solución (agua destilada), se adicionó 2,5 ml de reactivo de Lowry (Carbonato de Sodio al 2 % en Hidróxido de Sodio 0,1 N, más Tartrato de Sodio y Potasio y Sulfato de Cobre).

Se dejó en reposo 10 minutos, luego se adicionó 250 microlitros (ul) de reactivo de Folín diluido 1:2 en agua destilada y se dejó en reposo a temperatura ambiente por 30 minutos.

Se realizó la lectura de las absorbancias a 700 nm, frente al blanco.

Las concentraciones de proteínas se calcularon en base a la curva estándar realizada.

Diagrama III. Obtención de proteína de carne



Elaborado por: Del Pezo (2018)

3.4 Procedimiento de preparación del extracto de proteínas.

Para la extracción de proteína de carne, se seleccionó carne de bistec (falda), adquirida en una tienda de la ciudadela Santa Mónica – sur de Guayaquil, un corte muy común de diario consumo y que forma parte de la dieta de los guayaquileños.

Se procedió a pesar 100 gramos de la carne en la balanza marca Scout Pro, ubicada en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de CC.QQ.

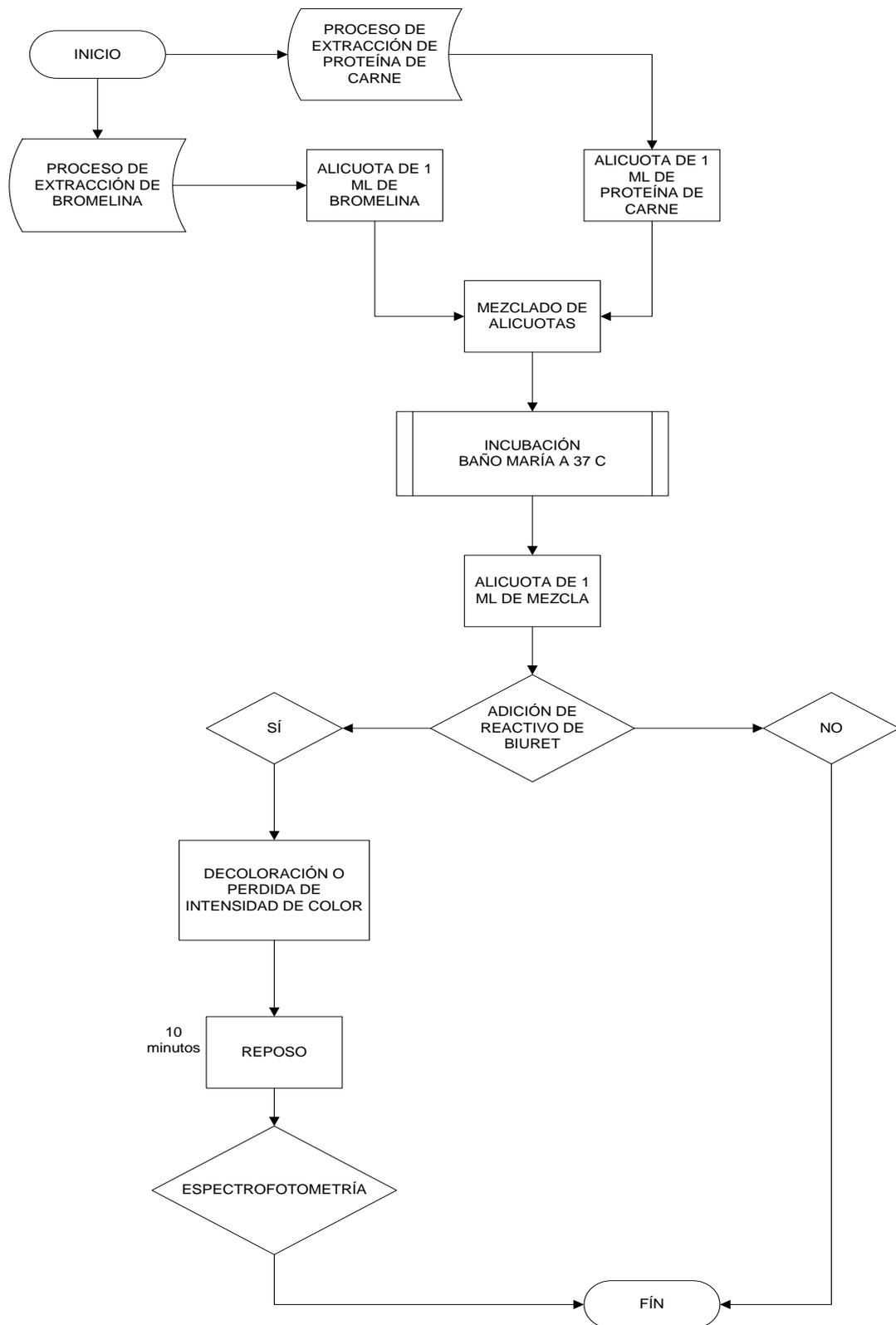
Se llevó la carne a un mortero de porcelana, se agregó 10 ml de agua destilada y con la ayuda de un pilón de porcelana, ejerciendo presión con movimientos suaves, se extrajo el jugo de la carne. Una vez concluido este proceso, se separó el líquido obtenido y se lo colocó en un tubo de ensayo. Se obtuvo un volumen de 25 ml de extracto acuoso de carne de bovino.

3.4.1 Determinación de proteína por el método de Biuret

En un tubo de ensayo se midió 1 ml de extracto acuoso de carne, se adicionó 3 ml de reactivo de Biuret, se mezcló, se dejó en reposo a temperatura ambiente por 10 minutos y se leyeron las absorbancias a 540 nm, frente al blanco, en el espectrofotómetro marca Sequoia – Turner Model 390, ubicado en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de CC.QQ.

Se calculó las concentraciones de proteínas en base a la curva estándar realizada (Gráfico I).

Diagrama IV Hidrólisis de proteína



Elaborado por: Del Pezo (2018)

3.5 Hidrólisis del extracto acuoso de carne de bovino por la enzima Bromelina.

Se colocó 1 ml de extracto de carne (proteína que no está hidrolizada), por cada uno de los 8 tubos de ensayos y se añadió 0,5 ml de extracto acuoso de Bromelina, en cada tubo. Se dejó incubar en baño de María a 37 °C, durante 15 – 30 - 45 y 60 minutos (2 tubos por tiempo).

Concluido el tiempo, se determinó la concentración de proteínas por el método de Biuret

La reacción de Biuret con las proteínas es en base a los enlaces peptídicos en la proteína sin hidrolizar, por tanto, la reacción es proporcional a la concentración de proteínas y a la integridad de los enlaces peptídicos.

La enzima Bromelina rompió los enlaces peptídicos; por tanto, el complejo coloreado de la reacción de Biuret, se debilitó conforme a la ruptura de los enlaces peptídicos, por lo que el color violeta intenso se volvió más pálido, propiedad que se utilizó para calcular la concentración de proteína hidrolizada, que fue medida con el espectrofotómetro en mención. La absorbancia fue menor que la proteína sin la enzima Bromelina, demostrando la ruptura de los enlaces peptídicos.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1 Resultado de proteínas por Biuret

Se realizó una curva estándar de calibración para la determinación de proteínas totales por el método de Biuret, usando 6 concentraciones diferentes (de 0 a 11 g/ dl); rangos que generaron la ecuación de la recta que se encuentra en el grafico I; la misma que se usó para la determinación de la concentración de proteínas totales en la carne de bovino a partir de las absorbancias obtenidas de las muestras de extracto de carne.

Tabla IX. Determinación de proteínas totales en extracto de carne

MUESTRA	ABSORBANCIA/MUESTRA	CONCENTRACIÓN (g/dl)
Extracto de carne	1.060	17.67
Extracto de carne	1.046	17.43
Extracto de carne	1.038	17.30
Extracto de carne	1.187	19.78
		X = 18.04

Elaborado por: Del Pezo (2018)

4.2 Resultado de proteínas por Lowry

Se realizó una curva estándar de calibración para la determinación de proteínas totales por el método de Lowry, usando 6 concentraciones diferentes (de 0 a 50 mg/ dl); rangos que generaron la ecuación de la recta que se encuentra en el grafico II; la misma que se usó para la determinación de la concentración de proteínas totales en la Bromelina a partir de las absorbancias obtenidas de las muestras de extracto acuoso de Bromelina.

Tabla X. Determinación de proteínas totales en la Bromelina, método de Lowry

MUESTRA	ABSORBANCIA	CONC. mg/dl
Tubo N° 1 Extracción con Etanol al 95%	1,55	228,5
Tubo N° 2 Extracción con Etanol al 95%	1,53	225,5
Tubo N° 3 Extracción con Etanol al 95%	1,45	213,75
Media		222,58

Elaborado por: Del Pezo (2018)

Tabla XI. Determinación de proteínas totales por el método de Lowry en los tres extractos

Extracción con Etanol 95%		Extracción con Etanol 90 %		Extracción con Etanol 75 %	
Absorbancia	Conc. mg/dl	Absorbancia	Conc. mg/dl	Absorbancia	Conc. mg/dl
1,55	228,5	2,77	408,35	2,32	342
1,53	225,5	2,60	383,29	2,25	331,69
1,45	213,75				
$\bar{X} = 1,51$	$\bar{X} = 222,58$	$\bar{X} = 2,69$	$\bar{X} = 395,82$	$\bar{X} = 2,29$	$\bar{X} = 336,85$

Elaborado por: Del Pezo (2018)

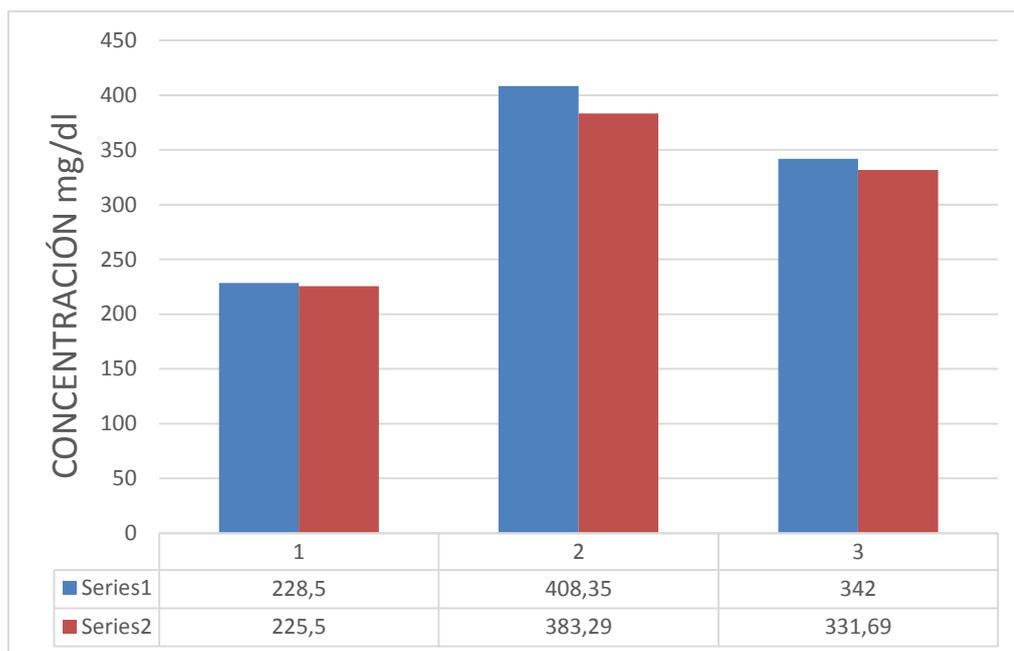


Gráfico III: Concentración de Bromelina extraída con Etanol de 95%, 90% y 75%

Tabla XII. Determinación de la actividad proteolítica de la enzima Bromelina

15 minutos		30 minutos		45 minutos		60 minutos	
Abs	C. g/dl	Abs	C. g/dl	Abs	C g/dl	Abs	C. g/dl
1,06	17,60	1,02	17	0,798	13,30	0,703	11,71
1,07	17,63	1,02	17	0,802	13,36	0,698	11,26

$$\bar{X}=1,07 \quad \bar{X}=17,62 \quad \bar{X}=1,02 \quad \bar{X}=17,00 \quad \bar{X}=0,80 \quad \bar{X}=13,33 \quad \bar{X}=0,70 \quad \bar{X}=11,49$$

Elaborado por: Del Pezo (2018)

Esta determinación se realizó con la enzima Bromelina extraída con Etanol de 95 %, considerando que el tiempo es un factor determinante en la actividad de la enzima.

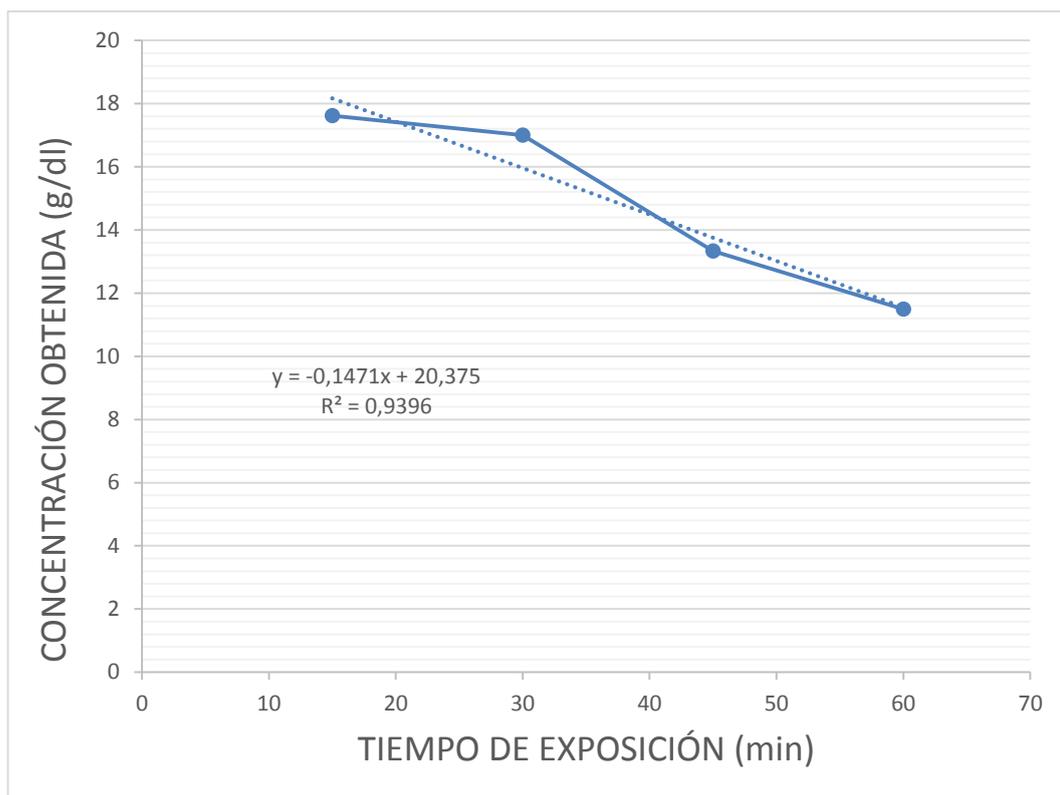


Gráfico IV. Tiempo de exposición vs concentración obtenida

Tabla XIII: Determinación de la actividad proteolítica de la Bromelina en tres extractos. (1 hora)

Extracción con Etanol 95%		Extracción con Etanol 90 %		Extracción con Etanol 75 %	
Absorbancia	Conc.mg/dl	Absorbancia	Conc. mg/dl	Absorbancia	Conc. mg/dl
0,676	11,26	0,658	10,80	0,596	9,78
0,670	11,16	0,647	10,62	0,580	9,52
X = 0,68	X = 11,21	X = 0,65	X = 10,71	X = 0,59	X = 9,65

Elaborado por: Del Pezo (2018)

La Bromelina obtenida con Etanol de 75 %, tuvo mejor rendimiento, hidrolizó mayor cantidad de enlaces peptídicos, liberando mayor número de aminoácidos

Tabla IV: Porcentaje de proteína hidrolizada

Proteínas totales	g %	% Proteínas sin hidrolizar	% Proteínas hidrolizadas
Ex. carne sin Bromelina	18	100	0
Ex. más Brom. Etanol 95 %	11,21	62,27	37,73
Ex. más Brom. Etanol 90 %	10,71	59,50	40,5
Ex. más Brom. Etanol 75 %	9,65	53,6	46,4

Elaborado por: Del Pezo (2018)

Para poder establecer los porcentajes de hidrolisis se realizó un cálculo de porcentaje tomando como referencia el valor de proteínas del extracto de carne de bovino (18 g), este valor corresponde al 100 % de la proteínas sin hidrolizar, luego se relaciona con el remanente de proteína sin hidrolizar en los extractos sometidos a la acción de la Bromelina, la diferencia constituye la proteína que se hidrolizó; logrando establecer que el porcentaje de hidrolisis fue mayor con la Bromelina obtenida a concentración alcohólica de 75 %. (46,4 g %)

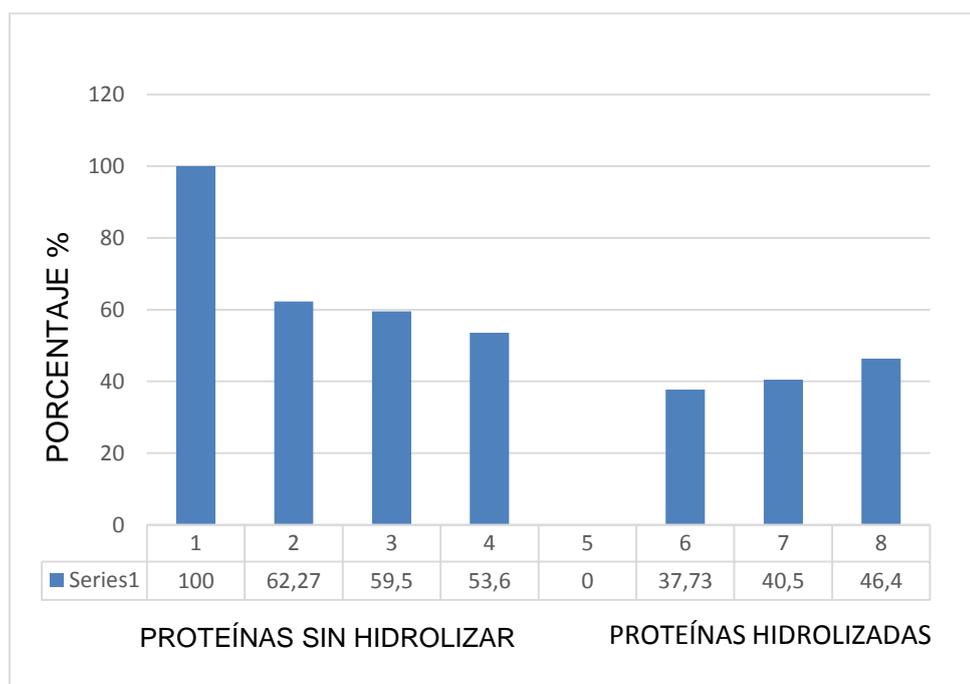


Gráfico V Porcentaje de proteínas hidrolizadas y sin hidrolizar

4.3 Discusión

Bromelina, enzima con acción proteolítica, es utilizada en la industria alimenticia como ablandador de carnes y en la industria farmacéutica como digestivo.

En la revisión del artículo publicado en Journal List. Biotechnol Res int.v2012 sobre las propiedades terapéutica y aplicación de Bromelina, in vitro e in vivo, evidencian que esta enzima, tiene actividades fibrinolíticas, antiedematosas, antitrombóticas y antiinflamatorias. No se menciona actividades proteolíticas. Además, Bromelina es considerablemente absorbible en el organismo humano, sin perder su actividad proteolítica y sin producir ningún efecto secundario importante (Pavan et al., 2012).

Según el artículo de la Revista CYTA Journal Food, hace referencia que la enzima Bromelina no solo es utilizada en la industria alimentaria como ablandador de carnes, en el tratamiento de pescado y otros productos marinos como la producción de salsa de ostras sino también en la producción de galletas para eliminar el gluten, se la utiliza como sustituto de los sulfitos para impedir el pardeamiento enzimáticos de los jugos de frutas y las propiedades terapéuticas como digestivo en tratamiento como la dispepsia, infecciones, edemas post operatorios y cáncer.

De acuerdo a la literatura consultada, no se encontró trabajos similares realizado por otros autores, relacionado al uso de Etanol, como medio de extracción de la enzima Bromelina de la Ananas comosus, para uso como ablandador de carne. La extracción en el presente trabajo se lo realizó con Etanol al 95, 90 y 75 %. La disolución de la enzima Bromelina, se realizó con agua destilada; no se utilizó agentes protectores de los grupos sulfidrilos (SH) presentes en los centros activos de la enzima, necesarios para la actividad catalítica; lo que hace suponer que la actividad de la enzima puede perderse con el tiempo por la oxidación de estos grupos al pasar a la forma disulfuro (S-S). Los agentes protectores de los grupos (SH) son reactivos como el β mercaptoetanol o el Sulfuro de Sodio que evita la oxidación de los grupos sulfidrilos (SH) y de esta forma la enzima

mantiene su poder catalítico más tiempo. Debe mencionarse que muchas enzimas deben su actividad a la integridad de los grupos sulfidrilos (SH)

Se logró obtener la enzima que ejerció la actividad proteolítica sobre el extracto acuoso de carne, según se muestra en Resultados.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

Según los trabajos de investigación revisados, la piña contiene en todas sus partes, pulpa, tallo y corteza la enzima llamada Bromelina que es una proteasa y que tiene función de hidrolizar los enlaces peptídicos de las proteínas.

Los objetivos planteados en este trabajo fue determinar la actividad proteolítica de la enzima Bromelina, obtenida de la corteza de la piña.

Según los resultados se concluye lo siguiente:

- La concentración de proteínas totales, por el método de Biuret en el extracto acuoso de carne de bovino, fue de 18.04 g.
- La concentración de proteínas totales por el método de Lowry, fue de 222,58 mg/dl de la enzima Bromelina obtenida con Etanol de 95 %; de 395,82 mg/dl con Etanol de 90 % y de 336,85 mg/dl, con etanol de 75 %.
- Hubo mayor actividad enzimática con el extracto de Bromelina extraída con etanol de 75%, hidrolizando un mayor número de enlaces peptídicos y por tanto disminuye la dureza de la carne.
- Después de la acción proteolítica de la Bromelina en los extractos acuosos de la carne, quedó un remanente de proteínas totales de 11,21g (con Etanol al 95%); 10,71 g (con Etanol al 90%) y 9,66 g (con Etanol al 75%)

- La actividad proteolítica de la Bromelina es: 37,73 % con el (extracto enzimático de Bromelina obtenido con Etanol (eeB) 95%); de 40,05 % con (eeB al 90%); y 46,4 % con (eeB al 75%). En consecuencia la ternura de carne bovina será mejor, con el eeB al 75%.
- Después de la acción proteolítica de la Bromelina extraída con Etanol de 95%, la concentración de proteínas fue de 17.63 g (15 minutos); de 17 g (30 minutos); de 13,36 g (45 minutos) y 11,26 g (60 minutos), en relación con los 18 g de proteínas del extracto acuoso de carne. En consecuencia, a mayor tiempo mayor actividad proteolítica de la enzima Bromelina.

5.2 RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar estudios bioquímicos a concentraciones no estudiadas de etanol para valorar la acción proteolítica de la enzima Bromelina y otras enzimas de origen vegetal.
- Realizar estudios sobre la cinética de la enzima Bromelina y obtener los parámetros como la constante de Michaelis – Menten (K_m) y velocidad máxima.
- Probar otros procedimientos de extracción que mejoren el rendimiento de la enzima.

BIBLIOGRAFÍA

Batallé, 2006. Calidad de carne y mejora genética. Recuperado en junio 2018 obtenido de <http://www.batalle.com/web>

Beriain, M.J., Sarries, M.V., Indurain, G. e Insausti, K. 2005. Análisis de la composición En ácidos grasos de la grasa animal, En Estandarización de las metodologías para evaluar la calidad del producto (animal vivo, canal, carne y grasa)

Coello, D., y Hidalgo, J. (2013). Comparación de la Concentración y Actividad Enzimática de la Bromelina a partir de la pulpa de la piña (Ananas Comosus) variedad perolera de dos grados de madurez Guayaquil, Guayas, Ecuador. Obtenido de <https://www.dspace.espol.edu.ec/retrieve/89709/D-79793.pdf>

DALGO (2012). Universidad Técnica de Ambato Facultad de Ciencia e Ingeniería de Alimentos carrera de Ingeniería Bioquímica. Recuperado el 10 de junio del 2018

FAO (2014), Perspectivas alimentarias - Análisis del mercado mundial. Recuperado el 9 de junio del 2018 de <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/background.html>

FAO. (2014). Consumo de Carne. Obtenido de Departamento de Agricultura y Protección del Consumidor: <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/background.html>

FAO. (2015). Composición de la carne Obtenido de Departamento de Agricultura Y Protección Del consumidor: http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/backgr_composition.html

GAUTAM S, *et. al*,(2010) Comparative Study of Extraction, Purification and

Estimation of Bromelain from Stem and Fruit of Pineapple Plant, Thai J. Pharm, India, 2010, Pág. 67-75.

Marrasquin (2016). Universidad Católica De Santiago De Guayaquil Facultad De Educación Técnica Para El Desarrollo Carrera De Ingeniería Agroindustrial Recuperado El 10 De Junio Del 2018, Efecto de la adición de una mezcla de Bromelina y Papaína sobre ciertas características físico químicas de la carne vacuna.: http://repositorio.ucsg.edu.ec/bitstream/3317/5407/1/T-UCS_PRE-TEC-CIA-2.pdf

Montoya, T., y Miano, A. (2011). Influencia de la concentración de cloruro de sodio y de extracto de corazón de piña (*Ananas comosus* –var roja trujillana) inyectados como solución en la textura (resistencia a la penetración) y capacidad de retención de agua (CRA) en carne De vacuno. Perú. Obtenido de:
<http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/agroindscience/article/view/103114>

PRO ECUADOR, Perfil de Piña Ecuatoriana, 2011, Consultado en: Enero 2018
Obtenido en Línea y Disponible en: <http://www.proecuador.gob.ec/>

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA, Determinación Cuantitativa de Proteínas, Consultado en: Enero 2018 Obtenido en Línea y Disponible en:
<http://www.quimica.unlp.edu.ar/>,

Zimerman, M. (2008). PH de la carne y factores que lo afectan. Aspectos estratégicos para obtener carne ovina de calidad en el cono sur americano. Buenos Aires, Argentina: Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Obtenido de:
http://www.produccionanimal.com.ar/produccion_ovina/produccion_ovina_carne/146_carne.pdf

ANEXOS

Anexo I: Obtención de la enzima Bromelina a partir de la corteza *Ananas comosus* (piña) variedad Perolera



Selección de la piña



Pelado de la piña



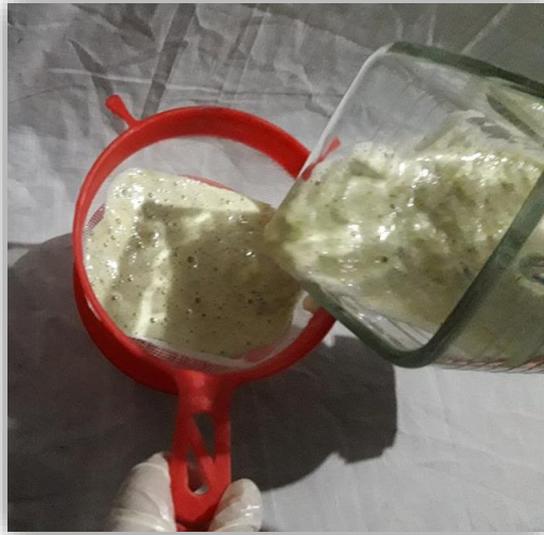
Separación de la corteza



Picado de la corteza



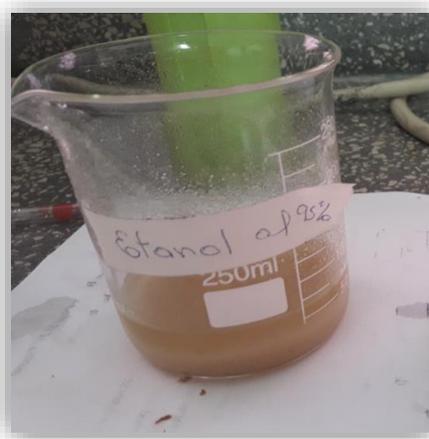
Triturado de la corteza



Filtrado del triturado



Medir volumen



Agregar Etanol

Anexo II: Obtención del extracto acuoso de carne de bovino



Triturado de la carne



Extracto acuoso de carne

Anexo III: Determinación de proteínas totales en el extracto acuoso de carne por el método de Biuret



Extracto acuoso de carne



Reacción positiva

Anexo IV: Determinación de proteínas totales en el extracto acuoso de Bromelina por el método de Lowry

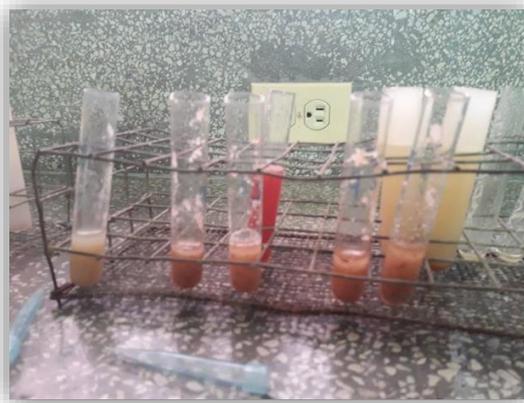


Extracto acuoso de Bromelina

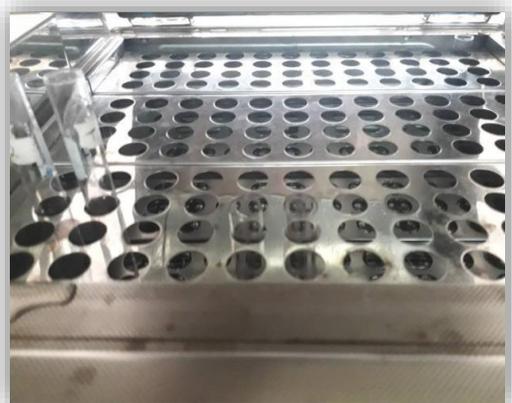


Reacción positiva para Bromelina

Anexo V: Determinación de la actividad enzimática de la Bromelina sobre el extracto acuoso de carne por el método de Biuret.



Extracto de carne con Bromelina



Incubar en baño María 37°C



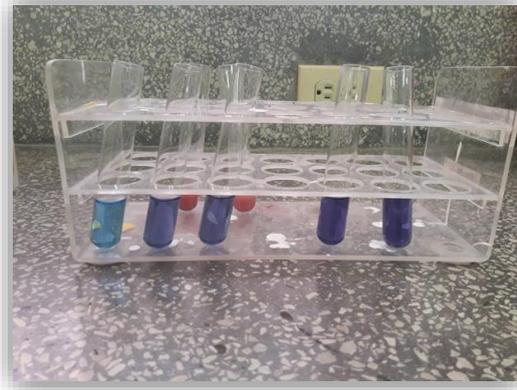
Complejo enzima - sustrato



Hidrólisis en 15 minutos



Hidrólisis en 30 minutos



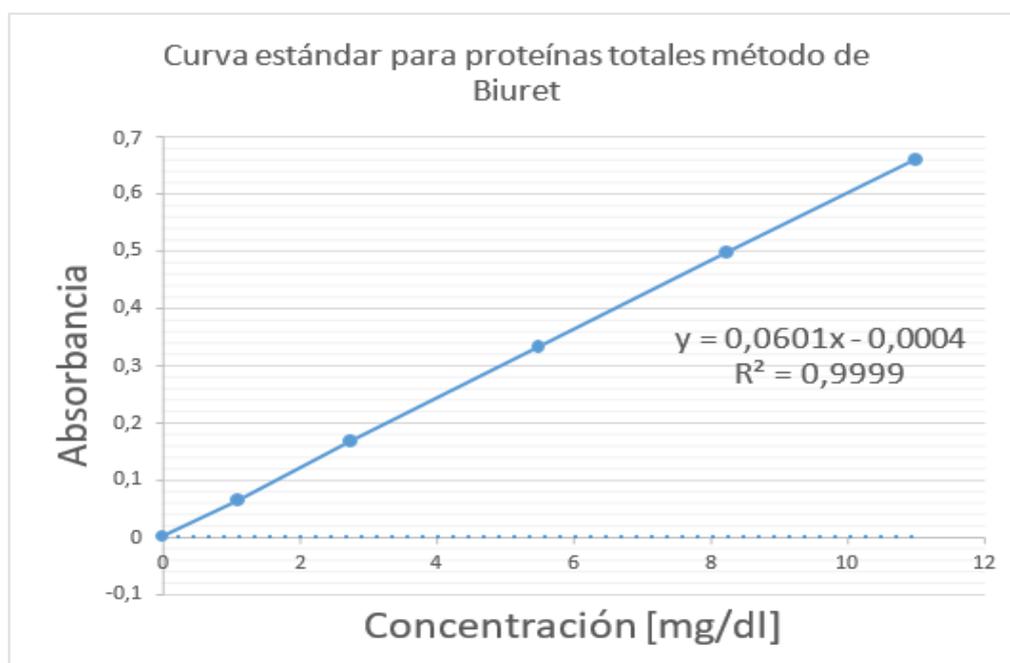
Hidrólisis en 45 y 60 minutos

Anexo VI. Cálculo para la determinación de proteínas totales por el método de Biuret

Curva estándar para proteínas totales método de Biuret

Abs	Abs 2	□ Abs	[mg/dl] BSA
0	0	0	0
0,058	0,065	0,0615	10
0,13	0,128	0,129	20
0,224	0,21	0,217	30
0,273	0,269	0,271	40
0,341	0,337	0,339	50
Σ		1,0175	150

m=	0,0069
R=	0,99851652

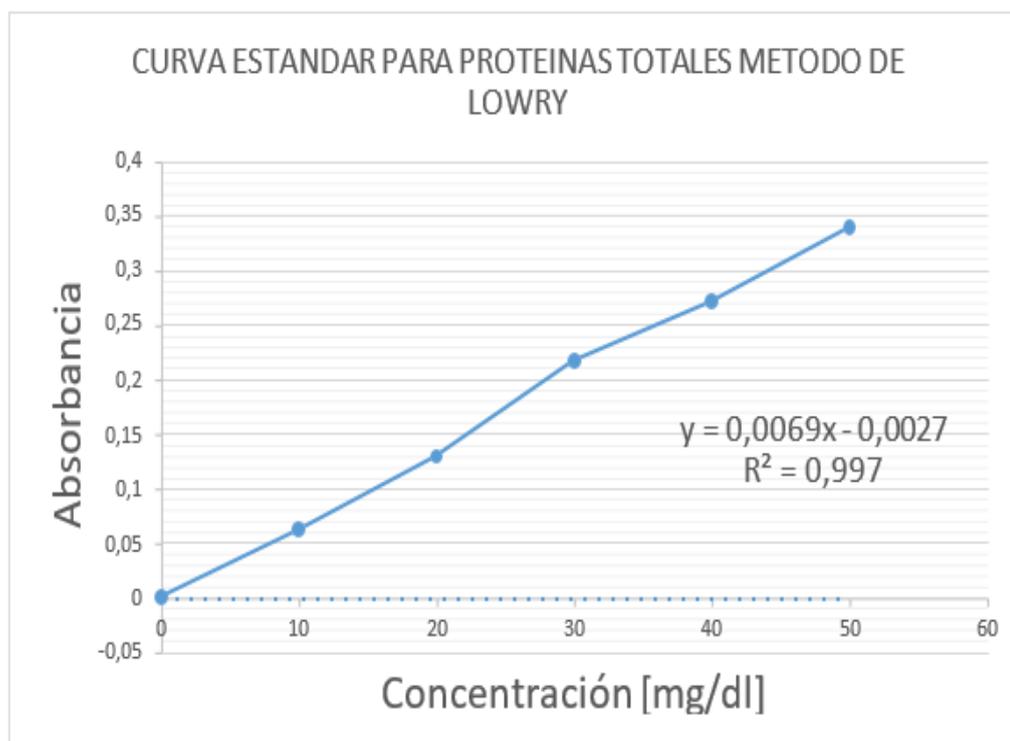


Anexo VII. Cálculo para la determinación de proteínas totales por el método de Lowry

Curva estándar para proteínas totales método de Lowry

Abs	Abs 2	□ Abs	[mg/dl] BSA
0	0	0	0
0,058	0,065	0,0615	10
0,13	0,128	0,129	20
0,224	0,21	0,217	30
0,273	0,269	0,271	40
0,341	0,337	0,339	50
	Σ	1,0175	150

m=	0,0069
R=	0,99851652



GLOSARIO

Actividad enzimática: Medida de la cantidad de enzima activa presente y del nivel de actividad de la misma, por lo que la medida de la actividad es dependiente de las condiciones, que deben ser especificadas cuando se dan valores de actividad.

Aminoácidos: Molécula orgánica con un grupo amino (-NH₂) y un grupo carboxilo (-COOH).

Apoplejía: Hemorragia dentro de un órgano o una pérdida de la circulación sanguínea que se dirige hacia un órgano, por un coágulo de sangre que taponar un vaso sanguíneo.

Catálisis: Proceso por el cual se aumenta la velocidad de una reacción química, debido a la participación de una sustancia llamada catalizador y aquellas que desactivan la catálisis son denominados inhibidores.

Enlaces peptídicos: Enlace químico que se establece entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino de otro aminoácido.

Hidrólisis: Descomposición de sustancias orgánicas e inorgánicas complejas en otras más sencillas por acción de agua.

Péptidos: Tipo de moléculas formadas por la unión de varios aminoácidos mediante enlaces peptídicos.

Proteólisis: Degradación de proteínas ya sea mediante enzimas específicas, llamadas peptidasas, o por medio de degradación intracelular.

Sustrato: Molécula sobre la cual actúa una enzima.

Terneza: Dificultad o la facilidad con la que una carne se puede cortar o masticar.

ABREVIATURAS

BSA: Albumina Sérica Bovina.

CC.QQ.: Facultad de Ciencias Químicas.

CRA: Capacidad de Retención del Agua.

DEAE: Dietilaminoetil.

EeB: Extracto Enzimático de Bromelina obtenido con Etanol.

ENSANUT: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición.

GDU: Unidades de Disolución de Gelatina.

K_m: Constante de Michaelis – Menten.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

SDS-PAGE: Sodio Dodecilsulfato- Poliacrilamida por Electroforesis en Gel.

UG: Universidad de Guayaquil.