

Extracción, cuantificación, identificación y determinación de la actividad enzimática de la bromelina contenida en el tallo del cultivo de *Ananas comosus*, comúnmente conocido como piña.

Antecedentes

En la actualidad el mundo globalizado ha traído como consecuencia graves problemas como desempleo, falta de vivienda, contaminación ambiental y el resurgimiento de enfermedades del pasado que se creían erradicadas, tales como la viruela, el sarampión, la tuberculosis entre otras, de igual manera el surgimiento de enfermedades que no mostraban tanta frecuencia tales como la diabetes mellitus, obesidad, bulimia, anorexia, cáncer, depresión, estrés y además enfermedades cardiovasculares, por lo que es fundamental en la actualidad llevar a cabo la investigación de principios activos de origen vegetal que contrarresten estos problemas de salud pública, en base a estudios realizados en diferentes países se ha encontrado que la piña presenta un amplio espectro de propiedades terapéuticas sobre el tratamiento de enfermedades como el cáncer así como sus efectos antisépticos y antitrombóticos, se ha encontrado que estas propiedades se deben a un principio activo de naturaleza proteica contenido en la piña que recibe el nombre de bromelina, misma que también se utiliza como ablandador de carnes y es así como surge la curiosidad y a la vez necesidad de llevar a cabo la realización de esta investigación.

Objetivo

Extraer, cuantificar, identificar y determinar la actividad enzimática de la bromelina contenida en el cultivo de piña.

Marco teórico

Las proteínas son moléculas formadas por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno y la mayor parte de ellas también contiene azufre, están formadas por cadenas de alfa aminoácidos que se encuentran unidas entre sí mediante enlaces peptídicos, las proteínas exhiben una gran diversidad funcional ya que pueden ser estructurales, protectoras, tóxicas, hormonales, mensajeras, contráctiles, transportadoras y enzimáticas. Las enzimas son proteínas producidas por células vivas que se encargan de catalizar reacciones bioquímicas termodinámicamente espontáneas, esta función la llevan a cabo mediante su sitio activo el cual es la porción de aminoácidos que se une al sustrato para que se lleve a cabo la reacción, la función de las enzimas es dependiente de una temperatura y pH óptimos, mismos que son específicos para cada enzima, en algunas ocasiones las enzimas requieren de la ayuda un cofactor o coenzima para llevar a cabo su función (Lehninger, 1995)

Las enzimas se clasifican en oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerazas y ligasas (J. I. routh, 1977)

La bromelina es una enzima perteneciente a las proteasas, se encuentra contenida en el cultivo de piña y dentro de sus usos se ha encontrado que se utiliza para mejorar la digestión, como antitrombótico, antitumoral, antiséptico entre otros (Revista Venemédica, 2004)

El cultivo de piña (*Ananas comosus*) pertenece a la familia de las bromelaceas, es una planta arbustiva que se adapta a diversos microclimas preferentemente en zonas tropicales y subtropicales, requiere de una precipitación que va de 800 hasta 1200mm y se puede encontrar en altitudes hasta de 800m sobre el nivel del mar, completa su ciclo vegetativo de 1 a 1.5 años de acuerdo a la variedad y de 3 a 5 meses en la maduración del fruto, las hojas del cultivo maduras son ricas en sílice y el peso promedio de los tallos va de los 250 a 400g (Jesús Fernández, 2005).

Metodología experimental

Metodología experimental

Extracción

Una vez realizadas varias pruebas con la finalidad de obtener la mejor mezcla de extracción que proporcionara el mejor rendimiento, se trabajó de la siguiente manera: primeramente se hizo una selección aleatoria del cultivo de piña, posteriormente se realizaron cortes finos de la muestra (tallo, fruto y follaje por separado), se pesó 2g de muestra la cual se colocó en un mortero de porcelana con pistilo para su maceración, se adicionó 5mL de agua destilada, una vez llevado a cabo el macerado se decantó a un tubo de ensayo y se colocó en un baño de hielo durante 5 minutos y se agregó 5mL de acetona fría (0-1°C) dejándose reposar hasta observar un precipitado blanco.

Cuantificación

Se realizó una curva de calibración con disoluciones estándar de albúmina sérica bovina a diferentes concentraciones mediante el método de Biuret agregando los contenidos como se indica en el cuadro número 1:

Tubo	Volumen de disolución estándar de albúmina sérica bovina (mL)	Concentración de la disolución estándar (mgmL ⁻¹)	Volumen de reactivo de Biuret (mL)	Volumen de agua destilada (mL)
B	0	0	3	2
1	0.3	0.3	3	1.7
2	0.4	0.4	3	1.6
3	0.6	0.6	3	1.4
4	0.8	0.8	3	1.2
5	1.2	1.2	3	0.8
6	2	2	3	0

Al mismo tiempo que se elaboraba la curva de calibración, a 10 tubos de ensayo con extracto se les agregó 3mL del reactivo de Biuret, para después de 20 minutos hacer la interpolación y obtener la concentración de proteína en el extracto.

Determinación de la actividad enzimática

Para la determinación de la actividad enzimática se rotuló 3 tubos de ensayo y a uno de estos se les adicionó disolución de caseína, a otro extracto y disolución de caseína y al último se le agregó únicamente extracto, en las cantidades mostradas en el cuadro número 2:

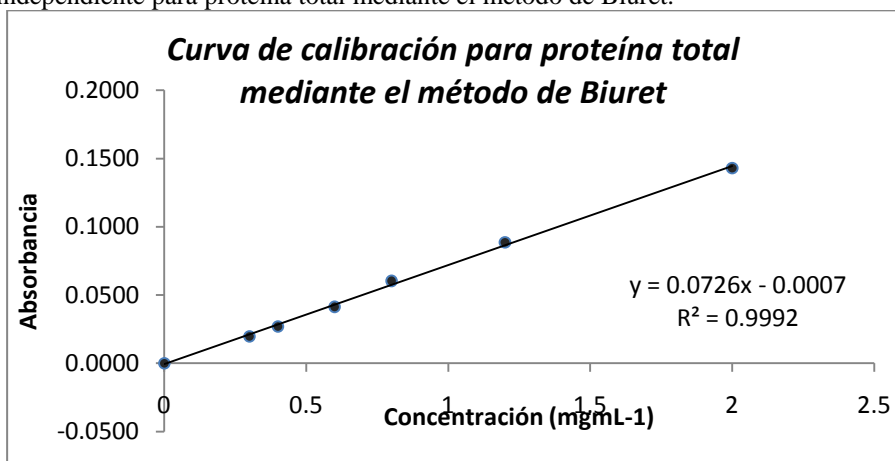
Tubo	Volumen de extracto (mL)	Volumen de disolución de caseína al 0.5% (mL)	Volumen de disolución buffer de fosfatos de (pH=6.5-6.7)(mL)	Volumen de ácido acético de concentración 1molL ⁻¹ (mL)
1	0	4	2	0
2	5	4	2	2
3	5	4	2	2

El ácido acético se adicionó sobre los tubos 2 y 3 después de 25 minutos, con la finalidad de evaluar la actividad enzimática del extracto, repitiendo el experimento a 5, 15, 25, 37 y 40°C.

Resultados

Cuantificación

El grafico 1 muestra los resultados obtenidos como promedio de 3 curvas de calibración efectuadas de manera independiente para proteína total mediante el método de Biuret.



Concentración media para el extracto del tallo: $1.006 \pm 0.0177 \text{ mgmL}^{-1}$
 Concentración media para el extracto de follaje: $0.249 \pm 0.0066 \text{ mgmL}^{-1}$
 Concentración media para el extracto de fruto: $0.524 \pm 0.01273 \text{ mgmL}^{-1}$

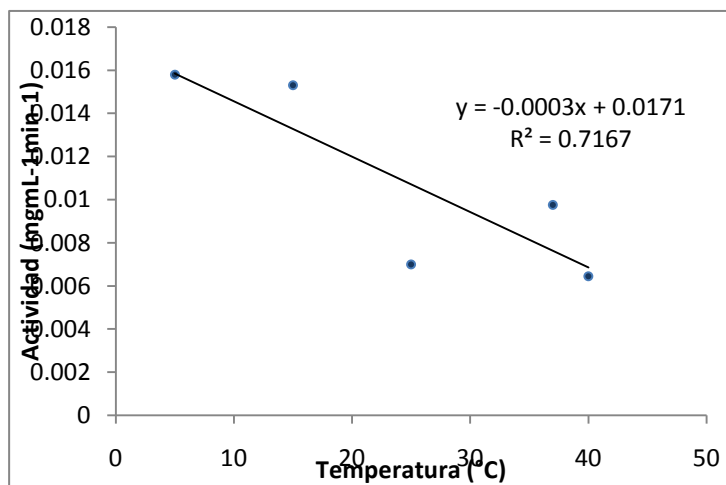
El cuadro número 5 muestra los resultados obtenidos para la cantidad de bromelina por gramo de muestra

Muestra	Concentración de bromelina (mg/g)
Tallo	7.55
Follaje	1.87
Fruto	3.93

El cuadro número 6 muestra los intervalos de confianza del 95% para la concentración media de bromelina en cada uno de los extractos para n-1 grados de libertad.

Muestra	Concentración de bromelina (mg/g)
Tallo	1.006 ± 0.0439
Follaje	0.249 ± 0.0164
Fruto	0.524 ± 0.0316

El gráfico número 2 muestra los resultados obtenidos como promedio de tres determinaciones independientes en cuanto a la dependencia de la actividad enzimática del extracto con respecto a la temperatura a pH constante.



Conclusión

- ❖ Se llevó a cabo la extracción, la cuantificación, la identificación y la determinación de la actividad enzimática de la bromelina contenida en el cultivo de piña (*Ananas comosus*).
- ❖ Las concentraciones medias en los extractos de tallo, fruto y follaje son significativamente diferentes por lo que se acepta la primera hipótesis nula.
- ❖ Algunos de los aminoácidos presentes en la bromelina y con los que se trabajó en este proyecto, si pueden ser identificados mediante reactivos específicos y cromatografía en papel por lo que se rechaza la segunda hipótesis nula.
- ❖ En virtud del coeficiente de correlación obtenido en la curva de calibración mediante el método de Biuret para proteína total, se puede cuantificar bromelina contenida en muestras del cultivo de *Ananas comosus* de manera confiable, por lo que se rechaza la tercer hipótesis nula.
- ❖ En base a los resultados arrojados por el gráfico número 2 se observa que la caseína es un buen sustrato para determinar la capacidad enzimática de la bromelina, así mismo se observa que la temperatura es un factor determinante en la evaluación de la misma por lo que la cuarta y la quinta hipótesis nula se rechazan.

Bibliografía

Obesidad; J. González McGraw- Hill, México 2003,
 Síndrome metabólico y enfermedad cardiovascular; A. Gonzalez, F. la Valle y J. Ríos (intersistemas SA. De C.V, México 2004)
 Química orgánica y bioquímica; Donald J. Burton y Joseph I. Routh; McGraw-Hill, Interamericana de México SA de CV, 1997
 Anatomía y Fisiología CP. Anthony, G.A. Thibodeau, McGraw-Hill, Interamericana de México SA de CV, 1983
 Venemédica, Acerca de la bromelina Rapha Health network Internacional news paper, volume 1, año 3, mayo de 2004
 Vitaminas, minerales, y suplementos herbales una nueva visión terapéutica médica; Dr. Alberto Guzman, MD, MS, PhD.