



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS



Trabajo de Titulación, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniero en Alimentos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Tema: “Inhibición de la actividad enzimática de lisozima de clara de huevo de gallina por presencia de metales pesados”

Este trabajo es parte del proyecto: **“Aislamiento y caracterización de nuevos ingredientes funcionales a partir de proteínas de *Amaranto* y *Quinoa* para la elaboración de un alimento funcional”** aprobado por el Honorable Consejo Universitario y financiado por la Dirección de Investigación y Desarrollo (DIDE) de la Universidad Técnica de Ambato. Resolución 1373-CU-P-2014.

Autor: Michael David Pazmiño Paredes

Tutor: PhD. Wilman Ismael Carrillo Terán

Ambato – Ecuador
Febrero 2017

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. Ismael Carrillo

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 09 de enero de 2017



PhD. Ismael Carrillo Terán

C.I. 17570800-4

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Michael David Pazmiño Paredes, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo la obtención del Título de Ingeniero en Alimentos son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



Michael David Pazmiño Paredes

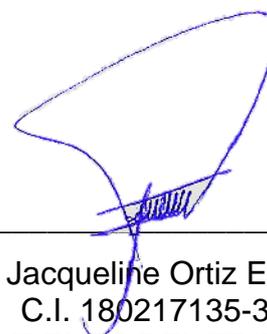
C.I. 180346753-7

AUTOR

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:



PhD. Jacqueline Ortiz Escobar
C.I. 180217135-3
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



PhD. Orestes López
C.I. 1754784864
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



PhD. Mayra Liliana Paredes
C.I. 0501873954
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ambato, 06 de Febrero de 2017

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de éste proyecto de investigación o parte de él un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de éste Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando ésta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Michael David Pazmiño Paredes

C.I. 180346753-7

AUTOR

DEDICATORIA

A Dios por haberme dado fortaleza para cumplir con mis metas propuestas durante toda mi vida, no solo en la vida estudiantil, sino en todos los años que me has dado.

He aprendido tanto de Ti, me apasiona tu forma de ser, tu naturalidad tan sobrenatural, tu estilo de amar tan incondicional. Has levantado a mi familia de la nada y la convertiste en lo mejor y después de todos estos años todo el mundo se da cuenta que nadie más pudo haberlo hecho, siempre fuiste Tú.

Para el Dueño y Señor de toda la creación, el Arquitecto del universo, mi Padre Bueno.

A toda mi familia, especialmente a mis padres; Mamá (Nancy) siempre creíste en mí, eres el ejemplo más valioso que tengo de persistencia, fortaleza y sacrificio o lo que podría definir en una sola palabra "Amor", renunciaste a todo para levantar a tu familia y hoy ves los primeros frutos (aún hay más); Papá (Patricio) sé que siempre estarás presente cuando te necesite, y siempre estaré presente si tú me necesitas a mí. A mis hermanos Mauro y Nathan, siempre pensé que yo era adoptado, me sentía tan diferente a ustedes, hasta que decidieron pelear por mí en una batalla que no les correspondía, gracias por hacerme entender lo que es pertenecer a una familia, a la mejor de todas, los admiro tanto. Los Amo.

Cuando era niño siempre soñé con ser astronauta, con los años me dí cuenta que las cosas no siempre salen como tú las planeas, a veces, solo a veces, las cosas salen mucho mejor. Conocerte me hizo entender que mi lugar no es el espacio, mi lugar es estar a tu lado. A ti que te quedaste conmigo cuando el resto se fue, y cuando supe que lo había perdido todo me demostraste que esa era precisamente la razón por la que debía seguir, porque no tener nada que perder significa que tienes mucho que ganar.



Michael

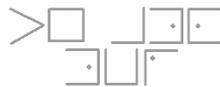
AGRADECIMIENTO

A la Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, por haberme capacitado en la Ciencia de los Alimentos y por la oportunidad de formarme como profesional.

Mi más sincera gratitud a mi tutor Dr. Ismael Carrillo, por haber aceptado guiarme en la ejecución del presente estudio. Gracias por su amistad, dedicación, tiempo y confianza depositada en mí, siendo una guía para la culminación de este trabajo.

Un agradecimiento al grupo que conforma Bio-Propepti por estar ahí presentes y dispuestos a compartir sus conocimientos, por haberme brindado su colaboración en la ejecución de este trabajo.

Finalmente quiero agradecer a quien, a pesar de no conocer mucho tiempo, se convirtió en mi inspiración y motivación para ser mejor. Aunque el camino se ha hecho difícil, no podría estar más seguro de que quiero caminar a tu lado, no importa el tiempo que tenga que esperar, puede ser un año o miles, pero nada se comparará a una eternidad junto a ti, y valdrá la pena haber iniciado este viaje juntos. Sabíamos que no iba ser fácil porque lo mejor de la vida no viene gratis, muchas gracias, contigo estoy seguro hacia donde voy.



Michael

Contenido

Introducción	9
Capítulo I	14
El Problema	14
1.1. Tema de investigación	14
1.2. Justificación	14
Capítulo II	21
Marco Teórico	21
2.1. Antecedente investigativos.....	21
2.2. Hipótesis.....	25
Ho: Los metales pesados no afectan la actividad enzimática de lisozima de clara de huevo.	25
Ha: Los metales pesados afectan la actividad enzimática de lisozima de clara de huevo.	25
2.3. Señalamiento de Variables.....	25
• Diferentes metales pesados y concentraciones de los mismos.....	25
• Actividad enzimática de lisozima de clara de huevo.	25
Capítulo III	26
Materiales y Métodos	26
3.1. Materiales	26
3.2. Métodos	27
Capítulo IV.....	32
Resultados Y Discusión	32
4.1. Análisis y discusión de resultados	32
Capítulo V	51
Conclusiones y Recomendaciones	51
5.1. Conclusiones.....	51
5.2. Recomendaciones.....	51
Bibliografía.....	52

Índice de Figuras

<i>Figura 1.</i> Descenso de la absorbancia a 450 nm de actividad de lisozima.....	34
<i>Figura 2a.</i> Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en Hg durante 4 horas a 450 nm.....	36
<i>Figura 2b.</i> Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en Hg por 12 horas a 450 nm.....	36
<i>Figura 2c.</i> Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en Hg por 24 horas a 450 nm.....	36
<i>Figura 2d.</i> Porcentaje de actividad enzimática de lisozima nativa comparada con lisozima incubada con Hg durante distintos tiempos de incubación.....	36
<i>Figura 3a.</i> Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en Pb por 4 horas a 450 nm.....	38
<i>Figura 3b.</i> Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en Pb por 12 horas a 450 nm.....	38
<i>Figura 3c.</i> Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en Pb por 24 horas a 450 nm.....	38
<i>Figura 3d.</i> Porcentaje de actividad enzimática de lisozima nativa comparada con lisozima incubada con Pb durante distintos tiempos de incubación.....	38
<i>Figura 4a.</i> Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en Ni por 4 horas a 450 nm.....	40
<i>Figura 4b.</i> Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en Ni por 12 horas a 450 nm.....	40
<i>Figura 4c.</i> Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en Ni por 24 horas a 450 nm.....	40
<i>Figura 4d.</i> Porcentaje de actividad enzimática de lisozima nativa comparada con lisozima incubada con Ni durante distintos tiempos de incubación.....	40
<i>Figura 5a.</i> Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en B por 4 horas a 450 nm.....	42
<i>Figura 5b.</i> Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en B por 12 horas a 450 nm.....	42
<i>Figura 5c.</i> Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en B por 24 horas a 450 nm.....	42
<i>Figura 5d.</i> Porcentaje de actividad enzimática de lisozima nativa comparada con lisozima incubada con B durante distintos tiempos de incubación.....	42
<i>Figura 6a.</i> Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en Cd por 4 horas a 450 nm.....	44
<i>Figura 6b.</i> Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en Cd por 12 horas a 450 nm.....	44
<i>Figura 6c.</i> Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en Cd por 24 horas a 450 nm.....	44
<i>Figura 6d.</i> Porcentaje de actividad enzimática de lisozima nativa comparada con lisozima incubada con Cd durante distintos tiempos de incubación.....	44
<i>Figura 7a.</i> Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en Cr III por 4 horas a 450 nm.....	46
<i>Figura 7b.</i> Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en Cr III por 12 horas a 450 nm.....	46
<i>Figura 7c.</i> Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en Cr III por 24 horas a 450 nm.....	46
<i>Figura 7d.</i> Porcentaje de actividad enzimática de lisozima nativa comparada con lisozima incubada con Cr III durante distintos tiempos de incubación.....	46
<i>Figura 8a.</i> Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en Cr VI por 4 horas a 450 nm.....	48
<i>Figura 8b.</i> Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en Cr VI por 12 horas a 450 nm.....	48
<i>Figura 8c.</i> Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en Cr VI por 24 horas a 450 nm.....	48
<i>Figura 8d.</i> Porcentaje de actividad enzimática de lisozima nativa comparada con lisozima incubada con Cr VI durante distintos tiempos de incubación.....	48

RESUMEN

La lisozima de clara de huevo es una enzima con actividad antibacteriana y antiviral comprobada. Se han realizado muchos trabajos de investigación para modificar y/o potenciar dicha actividad. En este estudio se evaluó si la presencia de metales pesados, como el Mercurio (Hg), Plomo (Pb), Níquel (Ni), Boro (B), Cadmio (Cd), Cromo III y VI (Cr III y Cr VI) modifican la actividad enzimática de esta enzima.

Mediante un análisis estadístico se encontró que los metales utilizados reducen la actividad enzimática de la lisozima de clara de huevo de gallina, siendo el Plomo con concentración 0,01M con 12 horas de incubación y plomo con concentración de 0,03M con 4 horas de incubación los que menor influencia tienen sobre la lisozima, reduciendo su actividad un 30% aproximadamente, haciendo que el descenso de la absorbancia sea menor, mientras que el tratamiento que contiene Cromo VI a concentración 0,01M con 24 horas de incubación tiene mayor influencia sobre la lisozima, inhibiendo su actividad casi en su totalidad, reduciéndola un 97%.

Palabras claves: *Lisozima, actividad enzimática, metales pesados, clara de huevo de gallina.*

ABSTRACT

Egg white lysozyme is an enzyme with antibacterial and antiviral activity. Many researches has been done to modify or enhance this activity. In this study was evaluated, if the presence of heavy metals such as Mercury (Hg), Lead (Pb), Nickel (Ni), Boron (B), Cadmium (Cd), Chromium III and VI (Cr III and Cr VI) influence the enzymatic activity of this enzyme.

Trought a statistical analysis was found that the metals used reduce the enzymatic activity of hen egg white lysozyme, Lead with concentration of 0.01M with 12 hours of incubation and lead with concentration of 0.03M with 4 hours of incubation it shows less influence on lysozyme, reducing its activity by approximately 30%, making the decrease in absorbance is lower, while the treatment containing Chromium VI with concentration of 0.01M with 24 hours of incubation has greater influence on the Lysozyme, inhibiting its activity almost entirely, reducing it by 97%.

Keywords: *Lysozyme, enzymatic activity, heavy metal, hen egg white.*

Introducción

En el medio ambiente, el huevo tiene un propósito fundamental, la conservación de la especie en los animales ovíparos. En estos animales las hembras colocan sus huevos con poco o ningún progreso embrionario, el mismo que se engendrará fuera del cuerpo de la hembra en el caso de los huevos fecundados. Así es como muchos peces, reptiles y anfibios, todas las aves, y la mayoría de los arácnidos e insectos se reproducen. Al estudio de los huevos especialmente los provenientes de las aves, se le denominada Oología, que es una rama de la Zoología (2009).

El huevo es el gameto (célula reproductiva) que aporta el miembro femenino en la reproducción sexual. Es un organismo unicelular, que posee forma esférica o más o menos elíptica (que se denomina ovoide). Después de la fecundación, alberga al embrión durante su formación, suministrándole todos los compuestos nutritivos la protección que necesita (en el caso de los huevos de reptiles, aves y monotremas, a través de la cáscara, o también llamada cascarón). En el avestruz, el huevo podría llegar a pesar hasta 1,5 kg, es la mayor célula individual que se conoce hasta el día de hoy. Dentro de la biología el término huevo (o cigoto) se le da a la célula resultante de la unión del gameto masculino con el femenino en la reproducción sexual de los animales y de las plantas. En el caso de las aves el equivalente sería el huevo una vez fecundado y que después de la incubación, originaría el nacimiento de un pollito. Desde la antigüedad el huevo de gallina (*Gallus gallus*) es un alimento muy importante para la humanidad y en la actualidad su consumo es casi generalizado en todo el mundo, esto ha generado una actividad de carácter económico, y sus operadores conforman un sector específico en el conjunto de la producción ganadera y la industria alimentaria. Los huevos de pato, codorniz y avestruz también son comercializados para su consumo, pero estos tres en su conjunto no tienen la relevancia económica del huevo de gallina (Anderson and Pascual 1999).

La normativa alimentaria de la Unión Europea define como huevos «los huevos con cáscara de aves de cría aptos para el consumo humano directo o para la preparación de ovoproductos». Dado que es considerado un alimento básico y muy apreciado no es de extrañar que el huevo haya sido desde tiempos inmemoriales motivo de interés y aún hoy en día es objeto de estudios e investigaciones desde los más diversos ámbitos (Monge-Nájera, Figueroa et al. 2002).

Por otra parte, los metales pesados son sustancias químicas pertenecientes a la naturaleza y que poseen un peso molecular alto, muy difundidos y en algunos casos muy útiles dentro de la sociedad, un ejemplo de ellos es el plomo que es utilizado en tuberías, también se encuentra el cadmio, el arsénico, el níquel que tienen distintas funciones. El plomo afecta varios sistemas, en el sistema nervioso llega a dañar a las neuronas particularmente las del cerebro. Este metal también afecta a la médula ósea y también suele acumularse en el riñón. Una intoxicación por plomo puede producir diversas enfermedades, como es la esclerosis, esta es una enfermedad incurable muy compleja hablando netamente de sus síntomas, también puede afectar al sistema nervioso con la misma sintomatología, como parestesias, parestias, fatiga, etc., y en general puede producir una disfunción, también hay una relación directa con el retardo mental y pérdida de las capacidades cognitivas (Romero Ledezma 2009). Un estudio demuestra que el daño al sistema nervioso central (SNC) como consecuencia de la exposición al plomo a los 2 años de edad produce una deficiencia continua en el desarrollo neurológico, que se manifiesta como una puntuación de CI más baja y una deficiencia cognitiva a la edad de 5 años (Gunnar 2013). El cadmio por su lado también tiene efectos dañinos en el riñón y el arsénico tiene un efecto directo en las mitocondrias. La inhalación de compuestos de cadmio en concentraciones en el aire superiores a 1 mg Cd/m³ durante 8 horas o en concentraciones superiores durante períodos más cortos puede producir una neumonitis química y, en los casos graves, edema pulmonar (Romero Ledezma 2009).

El cromo en cualquiera de sus variedades afecta principalmente a la piel y al aparato respiratorio. Puede producir úlceras en la piel, el tabique y laringe, dermatitis, necrosis renal, necrosis hepática, hemorragia gastrointestinal, cáncer de pulmón. (Gunnar 2013)

Una intoxicación con mercurio puede provocar daños en los riñones, el estómago, el sistema nervioso y la sangre. Aunque generalmente inicia con problemas en riñones, los daños en el sistema nervioso son más evidentes. Algunas de las enfermedades más comunes con intoxicación aguda de mercurio son: gingivitis, faringitis, mercurialentis y parkinson (Gunnar 2013).

Los riesgos para el hombre derivados de la exposición a níquel pueden ser alergias, rinitis, sinusitis, enfermedades respiratorias, cáncer de las cavidades nasales y de pulmón (Sunderman 2013).

Los daños en si son muy diversos dependiendo de cada metal. Los metales pesados influyen en la salud y tienen su efecto sobre diferentes órganos. Cada elemento contaminante tiene una forma de actuar y un lugar en el que suele acumularse (Romero Ledezma 2009).

Capítulo I El Problema

1.1. Tema de investigación

“Análisis de la inhibición de la actividad enzimática de lisozima de clara de huevo de gallina por presencia de metales pesados”

1.2. Justificación

La muramidasa (N-acetil muramidaglicano hidrolasa, E.C.3.2.1.17) o también conocida como lisozima fue descubierta por Alexander Fleming en 1922. Gracias a David Phillips se convirtió en la primera enzima de la que se determinó su mecanismo enzimático (Carrillo 2013).

Existen muchos tipos de lisozima, dependiendo del lugar de donde han sido extraídas, de todas éstas, la lisozima más estudiada ha sido la de huevo de gallina, debido a que su concentración es alta (1-3 g/l de clara de huevo), también su manejo es fácil, asimismo su purificación por cristalización en NaCl al 5% a pH 9,5 es posible. La lisozima puede representar el 3,5% de las proteínas en la clara de huevo. Además se define como una proteína muy catiónica, tiene un punto isoeléctrico elevado (pI= 10,7), tiene en su secuencia 19 aminoácidos cargados positivamente a pH neutro. Tiene cuatro puentes disulfuro, los mismos que le confieren una alta estabilidad, en ellos se encuentran las ocho cisteínas presentes en la molécula Su masa molecular es 14.307 Da y está compuesta de una secuencia de 129 residuos de aminoácidos. (You, Udenigwe et al. 2010).

Se ha estudiado que la lisozima tiene la capacidad de destruir las paredes celulares de algunas bacterias Gram-positivas mediante la ruptura del enlace β (1-4) entre el ácido N-acetilmurámico (NAM) y Nacetilglucosamina del peptidoglicano (NAG), de este modo la pared celular se debilita. Esto da como resultado la facilidad de ingreso de agua en la célula, la cual se hincha y estalla, a este fenómeno se lo llama lisis. Frente a microorganismos Gram-negativos la lisozima es casi inactiva debido a que poseen una membrana externa protectora que les dificulta acceder al peptidoglicano. (Carrillo, Garcia-Ruiz et al. 2014).

En muchos organismos se puede localizar a la lisozima, se encuentran en virus, insectos, anfibios, reptiles, aves y mamíferos por ejemplo, originándose en muchos de

los tejidos y fluidos, sin olvidar los huevos de aves, leche humana, lágrimas, saliva y también es secretada por leucocitos polimorfonucleares (Niyonsaba and Ogawa 2005). Para los humanos desempeña una función muy importante protegiéndolos de las infecciones. Por ejemplo, en las lágrimas se puede encontrar en cantidades que van desde los 3.000 hasta los 5.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y protege frente a bacterias y virus (Lesnierowski and Kijowski 2007). La lisozima en la saliva se encarga de proteger de una gran variedad de microorganismos como bacterias, virus y hongos de diferentes especies de *Candida* (Tenovuo 2002, Samaranayake, Cheung et al. 2009).

Se han definido muchas otras actividades biológicas de la lisozima, a parte de la actividad antibacteriana como la actividad antiviral. La lisozima previene enfermedades de la piel, como herpes simple y la varicela, debido a su actividad antiinflamatoria siendo administrada por vía oral y cutánea (Sava 1996). Además ha mostrado mediante ensayos *in vitro* que tiene actividad frente al virus del VIH tipo 1 (Lee-Huang, Huang et al. 1999). Otras actividades de la lisozima de huevo son: actividad antioxidante (Liu, Zheng et al. 2006), actividad antiheparínica (Mega and Hase 1994), actividad antifúngica, capacidad fusogénica con fosfolípidos y es un buen potenciador del efecto de antibióticos (Ibrahim, Matsuzaki et al. 2001).

La lisozima humana ha mostrado que actúa como agente inmunomodulante, al intervenir directamente en el mecanismo de defensa natural (Kozlov 2000, Cho, Fraser et al. 2005). Algunas organizaciones de nivel internacional como la FAO/WHO y países como Alemania, Australia, Bélgica, Dinamarca, España, Finlandia, Francia, Italia, Japón y Reino Unido han establecido que la lisozima de clara de huevo es una proteína no tóxica y totalmente útil para procesos de alimentos y en procedimientos farmacológicos y terapéuticos. En el año 2004 se estimó que más de 100 toneladas de lisozima son empleadas anualmente para estos propósitos (Mine, Ma et al. 2004). La FDA (Administración de drogas y alimentos en Estados Unidos) considera a la lisozima como un aditivo seguro (GRAS: Generalmente Reconocido como Seguro) para su aplicación en la industria quesera (Carrillo 2013).

En España la lisozima de huevo ya está catalogada como aditivo para fines alimentarios y tiene el código E-1105. Existen alimentos que han sido preservados por contacto de la superficie del alimento con la lisozima, este es el caso de los vegetales frescos, pescado, carne, frutas, langostinos y otros. Esta proteína ha sido ampliamente usada para conservar todo tipo de alimentos, así como pepinillos,

kimuchi, sushi y fideos chinos. En quesos se demostró que es útil para la protección frente al *Clostridium tyrobutyricum* y otras bacterias dañinas que provocan la hinchazón de los quesos. Hay varias patentes que garantizan el uso de la lisozima en bajas concentraciones, la cual controla el crecimiento de microorganismos en quesos durante más de 2 años. Además, se han creado plásticos que contienen biopolímeros adheridos con lisozima, estos son utilizados para conservar alimentos por contacto con los biopolímeros a modo de biopelículas (Mine, Ma et al. 2004).

La lisozima también va ganando gran importancia en la elaboración del vino. En enología comúnmente se ha utilizado el sulfito como conservante, éste protege los compuestos fenólicos de la oxidación operando a modo de antioxidante. También inactiva las oxidasas endógenas y se conoce que posee propiedades antibacterianas, especialmente en este caso, frente a las bacterias lácticas. En años recientes se ha desarrollado una tendencia y se desea disminuir el uso de sulfitos debido a que tienen un potencial efecto tóxico sobre la salud humana. De modo que en la fabricación de los vinos se ha señalado cantidades mínimas permitidas. Para sustituir al sulfito en las mencionadas funciones se ha llevado a cabo varios estudios para desarrollar protocolos enológicos con aditivos alternativos (Bartolomé, García-Ruiz et al. 2008). A partir de 1990, se dispuso que la lisozima de clara de huevo puede ser utilizada para controlar en el procesamiento de vinos la fermentación maloláctica, y así promover la estabilización microbiana del vino y prevenir el desarrollo de *Oenococcus oeni* y bacterias lácticas alterantes. Por otro lado, la Unión Europea en los reglamentos EC nº 1493/1999 y 1622/2000 establece que los límites del contenido total de SO₂ en los vinos tintos no podrán superar los 160 mg/L y en los blancos y rosados 210 mg/L. Conforme a la legislación de la comunidad europea EC Nr 2066 se permite agregar 500 mg/L para vinos tintos y 250 mg/L para los blancos (Weber, Steinhart et al. 2007, Sonni, Cejudo Bastante et al. 2009). La lisozima puede reemplazar totalmente a los sulfitos, se utiliza para controlar el crecimiento de bacterias lácticas (*Oenococcus*, *Lactobacillus* y *Pediococcus*), y posee poca acción sobre las bacterias Gram-negativas (bacterias acéticas) y levaduras por lo que la hace un sustituto ideal (Delfini, Cersosimo et al. 2004, Tirelli and Denoni 2007). La dosis de lisozima usada comúnmente está basada en la población bacteriana y tiene una relación directamente proporcional, a mayor población, mayor dosis se necesita. La concentración recomendada en mostos de vino es de 100-150 ppm (10-15 g/hl) tan pronto como sea posible para prevenir cualquier desarrollo bacteriano. Si un vino comienza a

desarrollar acidez volátil 250 ppm (25 g/hl) de lisozima ayudará a reducir la carga bacteriana pudiendo tener la acidez volátil bajo control. Al primer signo de parada de fermentación la Lisozima se deberá adicionar al mosto a concentraciones de 250-300 ppm (25 a 30 g/hl). La Lisozima puede proteger al vino terminado por inhibición de las bacterias remanentes del vino. La dosis apropiada en este caso es de 250 y 350 ppm (25-35 g/hl). Además, es interesante pues podría disminuir la cantidad de SO₂ necesario en vino y además controlar el desarrollo de las aminas biógenas y acidez volátil (VINOTEC 2013).

Existen sustancias que disminuyen de forma específica la velocidad de las reacciones enzimáticas, éstas se denominan inhibidores. En enzimología, los fenómenos de inhibición se estudian intensamente debido a su importancia en muchas áreas de investigación. Durante varios años los inhibidores se han clasificado como competitivos o no competitivos, términos que representan dos tipos generales de inhibición reversible. Tal como indica el primero, un inhibidor competitivo, se ha visualizado clásicamente como un compuesto que compite con un sustrato natural de una enzima por el sitio activo (del sustrato). Tal inhibidor es casi siempre similar estructuralmente al sustrato natural y, por imitación, se fija al enzima impidiendo la actividad catalítica. La inhibición competitiva es reversible y puede ser superada aumentando la concentración del sustrato. La efectividad de un inhibidor competitivo viene determinada por las afinidades relativas que tiene el enzima por el sustrato y por el inhibidor. La inhibición no competitiva se caracteriza, generalmente, por una inhibición de la actividad enzimática debida a compuestos que no poseen relación estructural con el sustrato y porque no se puede superar aumentando la concentración de sustrato. Los inhibidores no competitivos a diferencia de los inhibidores competitivos, no pueden interaccionar en el sitio activo sino que se han de fijar a otra zona del enzima o del complejo enzima-sustrato. Este tipo de inhibición comprende una serie de mecanismos inhibidores diferentes. Por ejemplo la inhibición por metales pesados es un tipo de inhibición no competitiva, los metales pesados forman mercáptidos con los grupos sulfhidrilo (-SH) de los enzimas. El equilibrio que se establece inactiva el enzima, que requiere un grupo sulfhidrilo libre para su actividad. Debido a la reversibilidad de la formación del mercáptido, la inhibición se puede eliminar removiendo el ion del metal pesado (Armstrong, Armstrong et al. 1982).

En varios estudios se ha demostrado que los metales pesados afectan a enzimas, en China por ejemplo se llevó a cabo una investigación para demostrar que la contaminación con metales pesados en el suelo afecta en varios aspectos, uno de ellos la actividad enzimática que se desarrolla dentro del mismo, y los resultados demostraron que, si bien la contaminación no logra inhibir la actividad enzimática en su totalidad, la disminuye en gran manera. El enzima estudiada fue la fosfatasa que se vio afectadas por cobre (Cu) y níquel (Ni) (Wang, Shi et al. 2007). En otro estudio indagaron sobre el efecto combinado de cobre (Cu), zinc (Zn) y plomo (Pb) sobre la actividad de la invertasa, ureasa y fosfatasa alcalina. Los resultados mostraron que estos metales influyen negativamente sobre las enzimas, disminuyendo su actividad, el cobre inhibe en mayor porcentaje a los enzimas que los otros dos metales (Feng, Teng et al. 2016). En la India se estudió la actividad enzimática de la ureasa, deshidrogenasa, fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y β -glucosidasa, exponiéndolas a cromo, cobalto, cobre, manganeso, níquel, plomo y zinc, donde se demostró que la actividad de los enzimas disminuyó significativamente con todos los metales utilizados, exceptuando el plomo que no produjo una disminución significativa en este estudio. (Pattnaik and Equeenuddin 2016)

Al hablar de metales pesados, Valencia (2016) nos menciona que hoy en día forman parte de los contaminantes atmosféricos, en su reporte indica que los contaminantes atmosféricos no solo ingresan en el cuerpo humano a través de la inhalación sino también mediante la ingestión. La contaminación atmosférica favorece en gran manera a la contaminación de los alimentos y agua que consumimos lo cual nos indica que en la mayoría de casos la ingestión sea la principal vía de entrada en el cuerpo humano de ciertos contaminantes, entre ellos los metales pesados (Valencia 2016). Como los metales pesados no son digeridos por el cuerpo, se acumulan en los tejidos provocando que los nutrientes esenciales no puedan ser absorbidos. Los metales pesados pueden producir inflamación crónica y deterioro del sistema inmune que puede llevar a enfermedades crónicas tales como la artritis y el cáncer. Comúnmente los síntomas de intoxicación por metales pesados incluyen depresión, dolores de cabeza, problemas digestivos, presión arterial alta, fatiga, dolor muscular, confusión mental, estreñimiento y desequilibrios hormonales. (Almeida 2013)

El Codex Alimentarius ha registrado ciertos límites para algunos contaminantes en alimentos, entre ellos se encuentran los metales pesados, para *Arsénico (As)* se tiene

como límite máximo permitido 0,15 mg/kg en grasas y aceites comestibles; el 0,01 mg/kg en Agua mineral natural y el 0,5 mg/kg en sal de calidad alimentaria. Para *Cadmio (Cd)* se tiene un límite máximo de 2 mg/kg en moluscos marinos bivalves; 0,5 mg/kg en sal de calidad alimentaria; el 0,4 mg/kg en arroz pulido; el 0,2 mg/kg en Hortalizas de hoja y en trigo; 0,1 mg/kg en hortalizas de leguminosas, legumbres, patatas, raíces y tubérculos, hortalizas de tallo y raíz, cereales en grano con excepción del trigo y la quinua; 0,05 mg/Kg en hortalizas de fruto y bulbo; 0,003 mg/kg en aguas minerales naturales. En el caso del *Plomo (Pb)* su límite máximo permisible es 2 mg/kg en sal de calidad alimentaria; 1,5 mg/kg en concentrados de tomate elaborados; 1 mg/kg en conservas de frutas, compotas, y encurtidos; 0,5 mg/kg en despojos comestibles de vacuno, porcino y aves; 0,3 mg/kg en hortalizas de hoja y bulbo; 0,2 mg/kg en bayas y frutas pequeñas, hortalizas de leguminosas, legumbres, cereales de grano excepto trigo y quinua; 0,1 mg/kg en frutas tropicales y subtropicales, cítricos, raíces y tubérculos, carne de vacuno, porcino y ovino, carne de aves, grasas y aceites comestibles; 0,05 mg/kg en zumos de frutas y 0,01 mg/kg en aguas minerales naturales. Para el caso del *Mercurio (Hg)* el límite permisible es 0,1 mg/kg en sal de calidad alimentaria y 0,001 mg/kg en aguas minerales naturales, en forma de *Metilmercurio* el límite permisible es de 1 mg/kg en peces depredadores y 0,5 mg/kg en pescado. También se da referencia del *Estaño (Sn)*, el que tiene límite máximo permisible de 250 mg/kg en alimentos enlatados, frutas en conserva, compotas y encurtidos; 150 mg/kg en bebidas enlatadas y 50 mg/kg en carne picada curada cocida, espaldilla de cerdo curada cocida, carne tipo “corned beef” y carne “luncheon”. (Codex, 1995 #118)

Además de estos metales mencionados la Unión Europea, agregó límites máximos para el *Cobre (Cu)*, siendo 30 mg/kg en el caso de zumos de frutas y jarabes naturales; 10 mg/kg para bebidas alcohólicas fermentadas y destiladas, caramelos, helados naturales, frutas, hortalizas, semillas oleaginosas y miel; 0,10 mg/kg en aceites y grasas comestibles. En el caso del *Cromo (Cr)* se especifica que la concentración no debe ser mayor de 0,10 mg/kg en cualquier alimento. El *Níquel (Ni)* tiene límites máximos de 4 mg/kg en productos hidrogenados; 3 mg/kg en zumos de frutas y jarabes naturales; y 0,10 mg/kg en refrescos y bebidas alcohólicas fermentadas y destiladas. (Díaz 2014)

El planeta Tierra se encuentra en una fase de activación volcánica, por ello muchos volcanes en el mundo se encuentran en proceso eruptivo, especialmente los de la Cadena del Pacífico. Los volcanes son fuentes naturales de contaminación. Una consecuencia de la actividad volcánica es alterar la calidad no solo del aire, sino del suelo y del agua simultáneamente. La presencia de sustancias y elementos tóxicos que se producen en la reacción química de las emisiones volcánicas con los factores ambientales, generan de forma natural la contaminación atmosférica en la zona de impacto (OMS 2010).

La cordillera de los Andes pasa estrechamente por Ecuador, así, por su ubicación geográfica está expuesto a la contaminación natural de sus volcanes, tres de los cuales se encuentran en proceso eruptivo en este último año (Tungurahua, Cotopaxi y Reventador). La contaminación afecta la alimentación de los animales que se encuentran en el campo como reses, corderos y aves de corral. Dentro de algunas granjas, las gallinas consumen alimentos que están en contacto con el suelo, influenciando directamente a su salud y por ende a los huevos que proporcionan. Es por ello que es importante investigar si los metales pesados inhiben la actividad enzimática de la lisozima de clara de huevo.

Objetivos

Objetivo General:

- Evaluar la inhibición de la actividad enzimática de la lisozima mediante el empleo de metales pesados.

Objetivo Específico:

- Cuantificar el porcentaje de inhibición de la actividad enzimática de lisozima
- Determinar que metal tiene mayor poder de inactivación sobre la actividad enzimática.
- Cuantificar la cantidad de metal presente en huevos de la zona.

Capítulo II Marco Teórico

2.1. Antecedente investigativos

La industria alimentaria se ve afectada, por la contaminación de alimentos. Este hecho genera pérdidas millonarias anualmente. Por ello, la industria alimentaria busca agentes antimicrobianos eficaces. En la actualidad, existe mucho interés por los agentes antimicrobianos de origen natural, debido a que por lo general presentan baja toxicidad, amplio espectro microbiano y su obtención es económica. Por ejemplo, desde hace décadas en la industria alimentaria se utilizan como conservantes la nisina una bacteriocina y la lisozima de huevo (Pellegrini 2003).

Existen muchos trabajos científicos que demuestran la actividad antibacteriana de la lisozima de clara de huevo de gallina. Por ejemplo, Hughey and Johnson (1987) indicaron que la actividad antimicrobiana de la lisozima tiene efecto contra las bacterias implicadas en el deterioro de los alimentos y las enfermedades transmitidas por los mismos. La lisozima demostró que tiene actividad antibacteriana frente a organismos de interés en la seguridad de los alimentos, incluyendo *Listeria monocytogenes* y ciertas cepas de *Clostridium botulinum*. También se encontró que el deterioro de los alimentos por *Clostridium thermosaccharolyticum* fue altamente susceptible a la lisozima y confirmó que organismos como *Bacillus stearothermophilus* y *Clostridium tyrobutyricum* también eran extremadamente sensibles. Varios patógenos Gram-positivos y Gram-negativos aislados de brotes de intoxicación alimentaria, incluyendo *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium* y *Yersinia enterocolitica*, eran resistentes. Los resultados de este estudio sugirieron que la lisozima puede haber seleccionado las aplicaciones en la conservación de alimentos, sobre todo cuando formadores de esporas termófilas son problemas, y como salvaguardia contra la intoxicación alimentaria causada por *C. botulinum* y *L. monocytogenes*.

Hughey, Wilger et al. (1989) determinaron la actividad antibacteriana de la lisozima de huevo de gallina contra *Listeria monocytogenes* Scott A en algunos alimentos. Demostraron que la lisozima fue más activa en los vegetales que en alimentos de origen animal estudiados. Para máxima actividad en ciertos alimentos, se adicionó

EDTA además de la lisozima. La lisozima con EDTA atacó efectivamente poblaciones inoculadas de 10^4 de *L. monocytogenes* por gramo en maíz fresco, habas verdes frescas, repollo rallado, lechuga y zanahorias durante el almacenamiento a 5 °C. Las incubaciones control sin lisozima indicaron el crecimiento de *L. monocytogenes* a 10^6 y 10^7 UFC/g. La lisozima tuvo menos actividad en los alimentos de origen animal, incluyendo salchicha fresca de cerdo (bratwurst) y queso Camembert. En bratwurst, lisozima con EDTA impidió el crecimiento de *L. monocytogenes* de 2 a 3 semanas, pero no atacó a un número significativo de células y no impidió su eventual crecimiento. Las salchichas de control que no contenían lisozima apoyaron el crecimiento acelerado, lo que indicaba que la lisozima era bacteriostática por 2 a 3 semanas en salchicha fresca de cerdo. También prepararon el queso Camembert con 10^4 células de *L. monocytogenes* por gramo e investigaron los cambios durante la maduración de quesos añadiendo lisozima y EDTA. Los quesos con lisozima en sí o con EDTA redujeron la población de *L. monocytogenes* en aproximadamente 10 veces durante las primeras 3 a 4 semanas de maduración. En el mismo período, en las ruedas de queso de control sin lisozima, con y sin quelante lentamente comenzaron el crecimiento y con el tiempo llegaron a 10^6 a 10^7 UFC / g después de 55 días de maduración. (Hughey, Wilger et al. 1989)

Además existen muchos trabajos que intentan modificar la actividad antibacteriana mediante tratamientos térmicos, tratamientos químicos, altas presiones, hidrólisis enzimática, modificación genética, etc. Para que sea capaz de atacar bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

Podemos mencionar estudios como, la actividad antibacteriana de lisozima de huevo de gallina, modificada por la técnica termoquímica, realizada por Cegielska-Radziejewska, Lesniewski et al. (2009) que determinaron la efectividad de la acción antibacteriana de lisozima modificada por técnicas termoquímicas contra cepas seleccionadas de bacterias. La investigación indica una posibilidad de ampliar la gama de actividad de la lisozima mediante modificaciones. Se ha encontrado que en las condiciones adoptadas promueven un aumento de la polimerización de la lisozima. Se observó que la temperatura y el tiempo tienen un efecto sobre el contenido de los polímeros que forman. Se encontró que la aplicación de la modificación de la lisozima conduce a un aumento de su actividad antibacteriana en comparación con la actividad de monómero de lisozima. Los experimentos han demostrado que las preparaciones

de lisozima utilizadas demuestran diferente actividad en relación con diferentes tipos de bacterias. El aumento en la actividad antibacteriana de las preparaciones de lisozima modificada contra bacterias Gram-negativas no se asoció con una disminución de dicha actividad contra las bacterias Gram-positivas. La mayor reducción del crecimiento de las especies de bacterias Gram-negativas examinadas se registró para la preparación que contenía la mayor cantidad del dímero (34-37,6%). Se observó una acción más eficaz contra las bacterias *Staphylococcus epidermidis* de los preparados que contienen 25-27% del dímero.

Carrillo, Garcia-Ruiz et al. (2014) estudiaron la actividad antibacteriana de la lisozima de huevo de gallina modificada por tratamientos térmicos y enzimáticos contra las bacterias enológicas de ácido láctico y bacterias del ácido acético. La lisozima nativa y la lisozima desnaturalizada por calor se hidrolizaron con pepsina. La actividad lítica contra *Micrococcus lysodeikticus* de la lisozima desnaturalizada con calor disminuye con la temperatura del tratamiento térmico, mientras que la lisozima hidrolizada no tenía ninguna actividad enzimática. Preparaciones de lisozima hidrolizada desnaturalizada por calor mostraron actividad antimicrobiana frente a bacterias de ácido acético. En uno de los tratamientos la lisozima fue calentada a 90 °C y ejerció una potente actividad contra *Acetobacter aceti* CIAL-106 y *Gluconobacter oxydans* CIAL-107 con concentraciones necesarias para obtener una inhibición del 50% del crecimiento (IC50) de 0,089 y 0,013 mg/ml, respectivamente. Esta preparación también demostró actividad contra *Lactobacillus casei* CIAL-52 y *Oenococcus oeni* CIAL-91 (IC50, de 1,37 y 0,45 mg/ml, respectivamente). Los dos hidrolizados de lisozima (nativa y desnaturalizada por calor) fueron activos contra la *O. oeni* CIAL-96 (IC50, de 2,77 y 0,3 mg/ml, respectivamente). Los resultados obtenidos sugieren que los tratamientos térmicos y enzimáticos aumentan el espectro antibacteriano de la lisozima de huevo de gallina en relación con los microorganismos enológicos.

Hoppe (2010) por su parte trabajó con alta presión sobre algunas proteínas de la clara de huevo para mirar su efecto en propiedades físicas y funcionales selectas. Los experimentos se realizaron utilizando espectroscopia Raman y la digestibilidad de la pepsina para investigar los cambios estructurales. El tratamiento a presión de 400 a 800 MPa (5 minutos a 4 ° C) produjo un aumento de la digestibilidad de la pepsina en las proteínas de la clara de huevo: ovoalbúmina, ovotransferrina, y lisozima, en comparación con un tratamiento térmico (85 a 95 ° C) y controles no tratados.

Se ha demostrado en estudios que los metales pesados inhiben la actividad de ciertas enzimas, Alnuaimi, Saeed et al. (2013) estudiaron el efecto de varios metales sobre la actividad enzimática de la Fosfatasa alcalina de *E. coli*, experimentaron con Cadmio, Mercurio, Cobre, Cobalto y Calcio, dando como resultado que todos ellos inhibieron la enzima en distintos niveles, siendo los más fuertes Mercurio, Cobre y Cobalto. También realizaron el mismo experimento mezclando dichos metales, encontrando que el Cobre y Mercurio tienen un efecto mayor sobre la inhibición enzimática, pero curiosamente el Calcio disminuye la actividad inhibitoria del Cadmio, lo que no ocurrió cuando se juntó Calcio con Mercurio. En resumen los resultados muestran que los contaminantes de metales pesados pueden inhibir fácilmente la enzima.

A pesar de la influencia de los metales sobre las enzimas Wyszowska and Wyszowski (2003) trataron de neutralizar el efecto negativo que tiene la contaminación con Cadmio sobre algunas enzimas encontradas en el suelo, mediante la aplicación de magnesio en Olsztyn, Polonia. La contaminación con cadmio disminuyó la actividad enzimática de la deshidrogenasa, ureasa, fosfatasa alcalina y fosfatasa ácida. La aplicación de magnesio al suelo redujo el impacto desfavorable del cadmio en deshidrogenasas durante la fase de elongación de los brotes en el suelo. Se observó tal influencia positiva del magnesio sobre la ureasa, tanto durante la fase de elongación de los brotes y en la cosecha, y en el caso de la fosfatasa alcalina y ácida mejoró sólo en la cosecha.

Donderski investigó acerca de la influencia de los metales pesados sobre la actividad de quitinasas. En la mayoría de las cepas ensayadas, iones de metales pesados inhibió la actividad quitinolítica conforme aumentó la concentración (Donderski 2005).

Sarosiek y colaboradores determinaron el efecto de iones de cobre, zinc, cadmio y mercurio en la actividad de algunas enzimas. La actividad de la fosfatasa ácida demostró ser relativamente insensible a los iones de zinc, mientras que los iones de cobre, mercurio y cadmio inhibieron eficazmente la actividad de esta enzima. La actividad de beta-N-acetilglucosaminidasa era sensible sólo a iones de mercurio. La actividad de la deshidrogenasa láctica no se vio afectada por metales pesados. Los resultados mostraron que, entre los metales examinados, mercurio tenía el efecto inhibitor más fuerte sobre las actividades enzimáticas. (Sarosiek, Pietrusewicz et al. 2009)

Moldovan y colaboradores sometieron la quitinasa a iones metálicos, los resultados mostraron que K, Mn, Na, Mg y Ca estimulan actividad quitinasa por 2, 4, 7, 15 y 21%, respectivamente, mientras que Cu, Fe, Zn, Ag y Hg inhiben la enzima. (Moldovan, Cheba et al. 2016)

2.2. Hipótesis

Hipótesis Nula

Ho: Los metales pesados no afectan la actividad enzimática de lisozima de clara de huevo.

Hipótesis Alternativa

Ha: Los metales pesados afectan la actividad enzimática de lisozima de clara de huevo.

2.3. Señalamiento de Variables

Variables independientes

- Diferentes metales pesados y concentraciones de los mismos.

Variables dependientes

- Actividad enzimática de lisozima de clara de huevo.

Capítulo III

Materiales y Métodos

Las pruebas experimentales se desarrollaron en el laboratorio de Alimentos Funcionales en el Grupo Bio-propepti, y el laboratorio de Físico - Química en la Facultad Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

3.1. Materiales

3.1.1. Materia prima

Para la determinación de metales en huevos se compró huevos en dos lugares, en una tienda barrial ubicada en la avenida los Andes (Ambato - Ecuador), y en el Megamaxi – Mall de los Andes, el producto que tiene como nombre de marca comercial “Pio”. Así de esta manera se tiene una marca comercial y una no comercial. Se adquirieron 2 docenas de huevos de cada uno de los lugares mencionados para su liofilización y su posterior determinación.

3.1.2. Equipos

- Agitador eléctrico vortex Mixer VWR
- Balanza analítica Precisa gravimétrica AG Pietikon
- Balanza analítica OHAUS Modelo V71P30T
- Congelador Panasonic Healthcare ultra-low Temperature freezer
- Horno de Mufla Nabertherm (Alemania)
- Liofilizador Bench Top Pro with Omnitronics Modelo BTP-3ES0VW
- Congelador Mabe
- Espectrofotómetro HACH convencional de haz simple Modelo DR-500
- pHmetro Mettler Toledo
- pHmetro Thermo Scientific Orion Star A211
- Refrigerador Indurama Modelo RI-470

3.1.3. Reactivos

- Cloruro de Mercurio [Hg_2Cl_2]
- Acetato de Plomo [$(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$]
- Cloruro de Níquel [$\text{NiCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$]
- Ácido Bórico [H_3BO_3]
- Cloruro Crómico [$\text{CrCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$]

- Oxido de Cromo [CrO₃]
- Fosfato de sodio 66 mM a pH 6,24 y 18°C,
- *Micrococcus lysodeitkticus*, (Sigma – St Lous USA) ATCC 4698
- Lisozima de clara de huevo (Sigma – St Lous USA)

3.1.4. Insumos y utensilios

Agua destilada, guantes, material de vidrio, bandejas plásticas, espátulas, gradillas, papel absorbente, papel de filtro, parafilm, tubos eppendorf, micropipetas, puntas, papel de aluminio.

3.2. Métodos

3.2.1. Análisis de metales pesados en huevos.

La determinación de metales pesados en las muestras de huevo se realizó en dos lugares, la determinación de plomo y cadmio se llevó a cabo dentro de las instalaciones de la Universidad Técnica de Ambato, en donde se aplicó la siguiente metodología:

Las muestras de huevos liofilizadas se incineraron a una temperatura de 550 °C usando un horno de mufla (Nabertherm, Alemania) hasta obtener una ceniza blanca o gris método Ramezani, Aghel et al. (2012) con modificaciones.

Estas cenizas se disolvieron en 0,50 mL de ácido clorhídrico y 0,25 mL de ácido nítrico, y se dejó en reposo por un lapso de 5 minutos. Las cenizas disueltas se aforaron en balones de 25 ml con agua tipo I (PGinstruments 2014).

Para la obtención de las curvas de calibración se utilizó patrones de cadmio y plomo de 1000 mg/L de la Empresa PG Instrument, y se preparó las siguientes soluciones: 0, 25, 50, 75 y 100 bnPv/ml y 0, 1, 2,3,4 y 5 cgCd/ml. (PGinstruments 2014).

Análisis de Cadmio y Plomo

Se siguió la metodología de Empresa PG Instrument, y se utilizó un equipo de Absorción atómica AA500 con horno de grafito. Se usó los siguientes parámetros en los análisis:

Tabla 1. Parámetros de análisis de Plomo y Cadmio por espectrofotometría de absorción atómica en horno de grafito AA500.

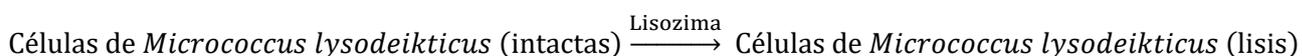
Parámetros de análisis	Plomo	Cadmio
Línea analítica	283.3 nm	228.8 nm
Banda ancha	0.4 nm	0.4 nm
Factor de filtro	0.1	0.1
Corriente de la lámpara	3.0 ma	5.0 ma
Tiempo de integración	3.0 sec	3.0 sec
Fondo/ambiente	Ninguno	D2
Tipo de grafito	Plataforma recubierta	
Tamaño de la muestra	10 µl	10 µl
Acidez	0.1% Nítrico	0.1% Nítrico
Rango de trabajo	1 – 100 ng/ml	

Fuente: PG, I. (n.d.). ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETER AA500. Retrieved from www.pginstruments.com

Para la determinación de los metales pesados restantes (Hg, Ni, B, Cr III y Cr VI) en las muestras de huevo se contrató el servicio de los Laboratorios UBA en Guayaquil – Ecuador, en donde se realizó la determinación por espectrofotometría de absorción atómica.

3.2.2. Determinación de la actividad enzimática de lisozima de clara de huevo.

El método que se utilizó está definido por Shugar (1952) y está descrito por Sigma Aldrich (casa comercial proveedora de lisozima de clara de huevo). Este procedimiento se puede utilizar para cualquier producto de lisozima. En el procedimiento se determina la velocidad de catálisis enzimática por la absorbancia a 450 nm A_{450} (la trayectoria de luz = 1 cm) que se basa en la siguiente reacción:



Una unidad de lisozima producirá un ΔA_{450} de 0,001 por minuto a pH 6,24 a 25 ° C utilizando una suspensión de *Micrococcus lysodeikticus* como sustrato en una mezcla de 2,5 ml de reacción.

Se preparó:

Soluciones tampón de fosfato de sodio a una concentración de 66 mM a pH 6,24 a 18°C,

Solución de células liofilizadas de *Micrococcus lysodeitkticus*, ATCC 4698 – concentración de 0.015% (p/v)

Solución de lisozima (Sigma – St Louis USA) 400 unidades/mg proteína.

Soluciones de Metales pesados:

- Cloruro de Mercurio [Hg_2Cl_2]
- Acetato de Plomo [$(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$]
- Cloruro de Níquel [$\text{NiCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$]
- Ácido Bórico [H_3BO_3]
- Cloruro Crómico [$\text{CrCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$]
- Oxido de Cromo [CrO_3]

* Cada solución de metal a concentración:
0.05M, 0.04M, 0.03M, 0.02M y 0.01M.

Instrucciones de preparación

Se usó agua ultra pura ($\geq 18 \text{ M}\Omega\text{cm}$ de resistividad a 25°C) para la preparación de reactivos.

Se preparó *Micrococcus lysodeitkticus* al 0,015% (p/v) en solución tampón fosfato de sodio 66 mM a pH 6,24. La absorbancia a 450 nm (A_{450}) de esta suspensión debe estar entre 0,6-0,7 frente a un blanco de tampón. Si es necesario, ajustar la absorbancia usando la cantidad adecuada de células de *Micrococcus lysodeitkticus*.

Se preparó la solución enzimática - control (lisozima de clara de huevo) inmediatamente antes de su uso, una solución contiene 400 unidades/ml de lisozima en frío ($2-8^\circ \text{C}$).

Para la determinación con metales pesados, la enzima (lisozima de clara de huevo) se preparó en las soluciones de los metales a estudiar a concentraciones de 0,01M, 0,02M, 0,03M, 0,04M, 0,05M, y se incubó a temperatura ambiente durante 4, 12 y 24 horas.

Procedimiento

Se utilizó cubetas para espectrofotometría, en donde se tomó una muestra control en la que se agregó lisozima nativa, y en el resto se utilizó la lisozima incubada con metal.

Como primer paso se ajustó el espectrofotómetro a cero con una solución tampón fosfato de sodio a A_{450} .

Luego se colocó la cubeta control y la cubeta de muestra y se añadió lo siguiente:

Tabla 2. Reactivos agregados a cubetas de control y muestra para medir disminución de absorbancia a 450 nm.

Reactivo	Control (ml)	Muestra (ml)
Suspensión sustrato (<i>Micrococcus lysodeikticus</i>)	2,5	2,5
Sol. Lisozima nativa	0,1	-
Sol. Lisozima incubada en metal	-	0,1

Realizado por: Michael Pazmiño

Como se muestra en la tabla 2, al agregar el primer reactivo (Suspensión sustrato de *Micrococcus lysodeikticus*) en la cubeta, se colocó en el espectrofotómetro y se midió inmediatamente la absorbancia a 450 nm (A_{450}), obteniendo así el primer dato que regularmente es un valor entre 0,6 y 0,8.

A continuación se agrega la solución de lisozima para cada caso (muestra o control). Se mezcló inmediatamente por inversión y se registró la disminución de A_{450} de cada cubeta por 5 minutos aproximadamente. Se obtuvo la velocidad lineal máxima ($\Delta A_{450}/\text{minuto}$), tanto para el control como para la muestra, utilizando al menos un intervalo de un minuto y un mínimo de 4 puntos de datos.

Para determinar el porcentaje de inactivación de la enzima se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Enzima inactiva} = \frac{\Delta A_{450}C/\text{min} - \Delta A_{450}M/\text{min}}{\Delta A_{450}C/\text{min}} * 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde:

$\Delta A_{450}C/\text{min}$ = Variación de absorbancia a 450 nm en el control

$\Delta A_{450}M/\text{min}$ = Variación de absorbancia a 450 nm en la muestra

Para calcular el porcentaje de enzima activa se restó del 100% el valor obtenido de la ecuación 1:

$$\% \text{ Enzima activa} = 100 - \% \text{ Enzima inactiva} \quad (\text{Ec. 2})$$

(Sigma 2013)

Análisis estadístico de resultados

Se realizó un análisis de varianza con interacciones de factores AxBxC. Siendo nuestra respuesta experimental el descenso de absorbancia a 450 nm obtenido en la determinación de la actividad enzimática. El análisis se realizó a través del paquete estadístico Infostat – Student. A continuación se presenta cada uno de los factores utilizados en el análisis.

Tabla 3. Factores Utilizados para el análisis de Anova

Factor	Detalle	Niveles Factores
A	Metal	1. Mercurio 2. Plomo 3. Níquel 4. Boro 5. Cadmio 6. Cromo III 7. Cromo VI
B	Concentración de Metal (Molaridad)	1. 0,01 M 2. 0,02 M 3. 0,03 M 4. 0,04 M 5. 0,05 M
C	Tiempo (horas)	1. 4 horas 2. 12 horas 3. 24 horas

Realizado por: Michael Pazmiño

Además del análisis de varianza se realizó una prueba de Tukey para determinar cuál es el metal que afectó en menor y mayor grado la actividad enzimática de la lisozima de clara de huevo de gallina.

Capítulo IV

Resultados Y Discusión

4.1. Análisis y discusión de resultados

4.1.1. Análisis de metales pesados en huevos de gallina

Según la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR, por sus siglas en inglés) hay datos disponibles sobre la influencia de los metales pesados en personas, algunos de ellos pueden producir cáncer. De los metales investigados en este trabajo que son compuestos cancerígenos para el ser humano según la ATSDR se encuentran: Mercurio (Hg), Níquel (Ni), Cadmio (Cd), y Cromo (Cr). Mientras que Plomo (Pb) y Boro (B) aún están siendo sometidos a investigaciones y no se tienen evidencias suficientes para marcarlos como compuestos cancerígenos, esto no quiere decir que sean confiables, según la Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) el consumo de estos metales puede afectar el sistema respiratorio, el sistema nervioso y el cerebro, incluso puede causar la muerte dependiendo de la cantidad que haya sido ingerida. (ATSDR 2016)

En Ecuador no se encuentran reportes previos de haber identificado metales pesados en huevos, pero existen datos de otros países que han determinado ciertos metales en este alimento.

En Egipto se encontró Cu (0,644 ppm), Zn (53,35 ppm) y Pb (0,23 ppm) (Azza 2011). En Londres se determinó niveles de Pb (0,242 pm), Cr (0,078 ppm), Cu (0,84 ppm), Fe (12,27 ppm), Mn (0,364 ppm) y Zn (11,615 ppm) (Siddiqui, Nazam et al. 2011). En Perú se halló Pb (0,16 ppm), Cd (0,009 ppm) y Hg (0,093 ppm), (González 2015).

Mediante espectrofotometría de absorción atómica se analizó algunos metales en dos muestras de huevo procedentes de distintos lugares del Ecuador, en donde se obtuvo los siguientes resultados:

Tabla 4. Resultados de análisis de metales pesados en huevos

Metal Analizado	Límite de Detección	Unidades	Muestra Comercial (Pio)	Muestra no Comercial
Mercurio	2,5	µg/kg	<2,5	<2,5
Plomo*	0,01	mg/kg	0,53	0,26
Níquel	-	mg/kg	1,13	0,93
Cadmio*	0,1	mg/kg	<1,0	<1,0
Boro	0,5	mg/kg	<0,5	<0,5
Cromo	5,0	mg/kg	1,83	0,16

Fuente: Laboratorios Analíticos UBA, Laboratorios FCIAL(*)

Realizado por: Michael Pazmiño

En la tabla 4 se observa los resultados obtenidos del análisis de la determinación de metales pesados mediante espectrofotometría de absorción atómica, y se puede mirar que la muestra comercial (Pio) tiene una cantidad de Plomo equivalente a 0,53 mg/kg, Níquel 1,13 mg/kg y una porción de Cromo de 1,83 mg/kg. Mientras que la muestra

no comercial posee menor cantidad de metal que la primera muestra mencionada, teniendo 0,26 mg/kg de Plomo, 0,93 mg/kg de Níquel y 0,16 de Cromo.

Según la ATSDR los niveles mínimos de mercurio (Hg) en agua son 2ppmm (partes por mil millones) y 1 ppm (partes por millón) en mariscos (ATSDR 2016). La Unión Europea estableció como límite en productos de pesca menos de 0,5 ppm (Díaz 2014). En el presente estudio no se encontró evidencia alguna de que haya mercurio en los huevos analizados.

El plomo tiene como límite 15 µg/litro de agua (ATSDR 2016), y 0,1 ppm en carnes de bovinos, ovinos, cerdos, aves de corral y ciertas frutas (Díaz 2014). En los análisis realizados no se encontraron restos de plomo en las muestras de huevo utilizadas.

El Níquel puede estar presente en 0,1 mg/litro de agua (ATSDR 2016), y según la legislación alimentaria de Suiza tiene un límite máximo de 0,2 ppm en grasas comestibles (Díaz 2014). En las muestras de huevo estudiadas en este trabajo se encontró que los niveles de níquel sobrepasan estos límites establecidos, ya que se halló un mínimo de 0,93 ppm de Níquel.

El boro no ha mostrado efectos adversos al ingerir 4 mg/litro de agua durante un periodo de 10 días (ATSDR 2016), la legislación alimentaria de Suiza estableció el límite de 80 ppm en vinos (Díaz 2014). No se encontraron restos de boro en las muestras estudiadas en este trabajo.

El cadmio ha demostrado que concentraciones inferiores a 0,04 mg/litro de agua por periodos de hasta 10 días no causará efectos dañinos en la salud, y se ha establecido como límite 0,005 mg/litro en agua embotellada (ATSDR 2016). La Unión Europea tiene un límite máximo permisible de 0,1 ppm en hortalizas de raíz y tubérculo y patatas (Díaz 2014). No se obtuvieron restos de cadmio en las muestras de huevo estudiadas.

Finalmente el Cromo se ha determinado que en concentraciones menores a 0,1 mg/litro de agua no causa efectos adversos en la salud, como dato adicional ATSDR concluyó que en Estados Unidos los límites legales en el aire de trabajo no deben contener más de 0,5 mg de Cr (III)/m³ y 0,005 mg de Cr (VI)/m³ durante jornadas de 8 horas de trabajo (ATSDR 2016). Según la legislación alimentaria de Brasil cualquier alimento no puede contener más de 0,10 ppm de cromo (Díaz 2014). Nuestro estudio demuestra que tenemos 0,16 ppm en muestras de huevo, lo que significa que se encuentran sobre el límite establecido en Brasil.

4.1.2. Análisis de la Inhibición enzimática de lisozima de clara de huevo de gallina por la presencia de metales pesados.

Durante todos los ensayos de este trabajo se usó lisozima de grado estándar de la casa comercial sigma que fue preparado a 400 U/ml con solución tampón y paredes liofilizadas de *Micrococcus lysodeikticus* de la casa comercial sigma como sustrato de la lisozima (enzima) el cual fue preparado a la concentración de 0,015% (p/v). Se midió el descenso de la solución de *Micrococcus* por parte de la lisozima a 450 nm durante ocho minutos. De esta manera se determinó la actividad enzimática de la

lisozima nativa. Estos resultados fueron usados como control para todos los ensayos (figura 1).

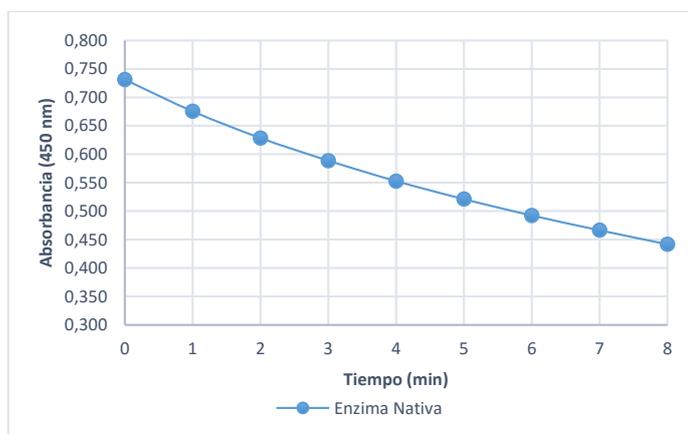


Figura 1. Descenso de la absorbancia a 450 nm de actividad de lisozima.

4.1.2.1. Análisis de Mercurio

La solución de lisozima fue incubada con el metal Mercurio (Hg) a diferentes concentraciones 0,01M; 0,02M; 0,03M; 0,04M y 0,05M, previo a la medición la solución de lisozima fue incubado con el metal durante 4,12 y 24 horas. Pasado el tiempo se agregó a la solución de *Micrococcus* y se midió el descenso de la absorbancia a 450 nm durante ocho minutos. Los ensayos fueron realizados por triplicados. En los resultados de gráficos se expresa la media de las tres medidas obtenidas.

En la figura 2a se puede observar que el descenso de la absorbancia fue inversamente proporcional a la concentración del metal. A mayor cantidad del metal menos descenso de la absorbancia hubo. Además se pudo ver que a 0,05M (la mayor concentración) de mercurio presente en la solución de lisozima incubada durante 4 horas el descenso de la absorbancia fue leve. En el transcurso de 12 horas el descenso de absorbancia de lisozima incubada a 0,05M de concentración de Hg medida a 450 nm es menor que los ensayos realizados a 4 horas (figura 2b). En la figura 2c podemos observar que a mayor tiempo de incubación (24 horas) de la enzima (lisozima) con el metal, mayor fue la pérdida de su actividad.

En la figura 2d se observa que el descenso de la absorbancia mostrado en las gráficas anteriores, al incluirlo en la fórmula de porcentaje de actividad enzimática (Ec. 2) refleja la actividad enzimática residual de la enzima (lisozima). Se puede observar que la concentración de 0,05M de mercurio la lisozima (enzima) solo conserva un 33% de su actividad enzimática después de las 4 horas de incubación, con lo que nos indica que ha perdido un 67% de su actividad, Mientras que la concentración de 0,01M de mercurio, la lisozima conserva el 71 % de su actividad, perdiendo el 29% a causa de la presencia del metal. La pérdida de la actividad enzimática de la lisozima fue directamente proporcional a la concentración de metal (Hg).

A las 12 horas de incubación con la concentración más alta de mercurio utilizada (0,05M), la lisozima conserva el 29% de la actividad enzimática, perdiendo el 71% de su actividad normal y a concentración menor (0,01M) de mercurio, la lisozima tiene una actividad del 53% que representa la pérdida del 47% de actividad enzimática en el transcurso de 12 horas (figura 2d).

Inoculando la enzima (lisozima) a una concentración de 0,05M de mercurio solo logró conservar un 16% de su actividad enzimática, lo cual nos indicó que perdió un 84% de su actividad enzimática natural para destruir las paredes de *Micrococcus* (sustrato), pero a 0,01M de mercurio se conserva el 36% y pierde el 64% de su actividad a las 24 horas de inoculación (figura 2d).

Esto nos indica que mientras mayor sea el tiempo de incubación de la enzima (lisozima) en mercurio, mayor será afectada su actividad. Así también con la concentración de mercurio, si la concentración es mayor, la actividad enzimática se reduce más.

Existen trabajos que demuestran que el mercurio afecta la actividad de enzimas. Krawczyński comprobó que diferentes compuestos de mercurio [$\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$, HgCl_2 y $\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2$] inhiben la ureasa. (Krawczyński vel Krawczyk, Moszczyńska et al. 2000). Mohammadi determinó que el mercurio inactiva la invertasa desde concentraciones mayores a 10^{-8} M de mercurio (II) (Mohammadi, Amine et al. 2005). Mientras que Carvalho observó una inhibición mediante mercurio (HgCl_2) de la actividad tanto la tiorredoxina reductasa (TrxR) y tiorredoxina (Trx) (Carvalho 2008).

Si bien se ha demostrado mediante varios trabajos que el mercurio afecta negativamente la funcionalidad de algunas enzimas y aunque no se especifica en los trabajos revisados el porcentaje de actividad residual de las enzimas, se conoce que afecta negativamente, reduciendo la actividad de varias enzimas, coincidiendo que el nivel de afección depende de la concentración y el tiempo que estuvo expuesta la enzima al mercurio.

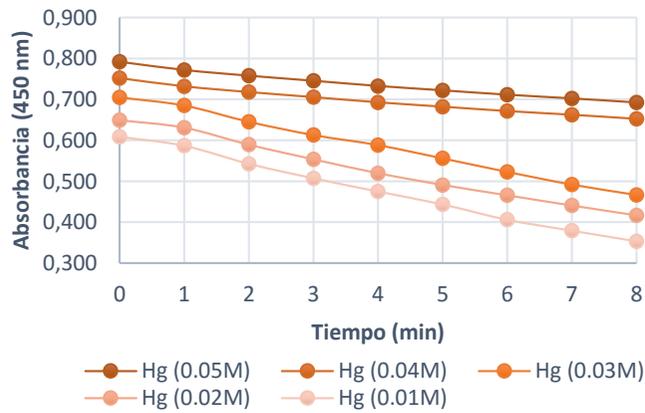


Figura 2a. Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en Hg por 4 horas a 450 nm.

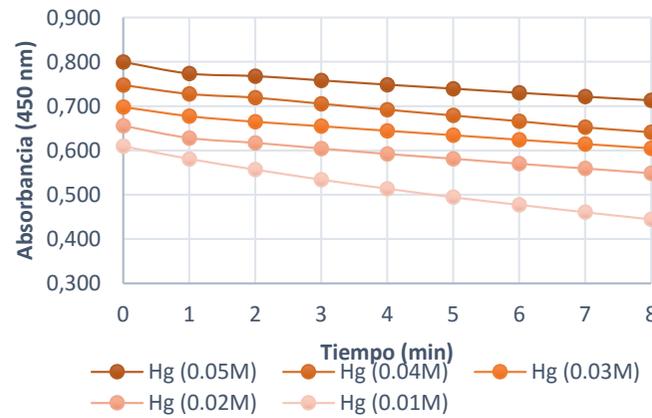


Figura 2b. Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en Hg por 12 horas a 450 nm.

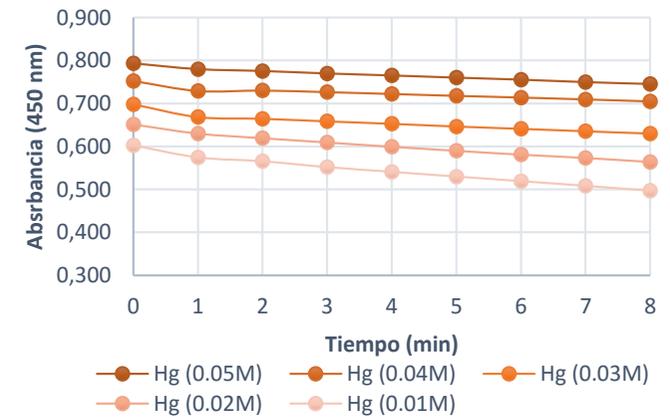


Figura 2c. Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en Hg por 24 horas a 450 nm.

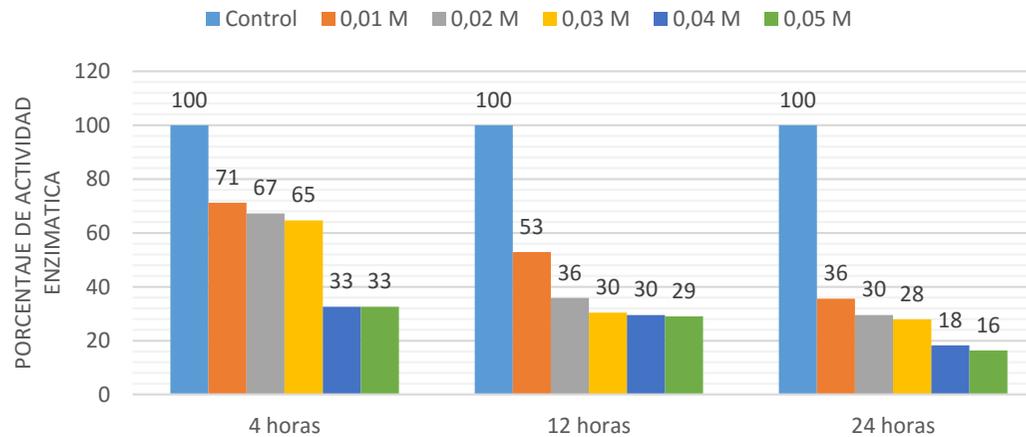


Figura 2d. Porcentaje de actividad enzimática de lisozima nativa comparada con lisozima incubada con Hg durante distintos tiempos de incubación.

4.1.2.2. Análisis de Plomo.

La lisozima fue sometida a la presencia de Plomo (Pb) a diferentes concentraciones 0,01M; 0,02M; 0,03M; 0,04M y 0,05M; la enzima fue utilizada en la solución de *Micrococcus* donde se midió el descenso de la absorbancia a 450 nm durante ocho minutos. Los ensayos fueron realizados por triplicado. En los resultados de gráficos (figura 3a, 3b y 3c) se expresa la media de las tres medidas obtenidas. Previo a la medida la solución de lisozima fue incubado con el plomo durante 4,12 y 24 horas.

El ensayo de lisozima incubada durante 4 horas con plomo demostró que el descenso de la absorbancia fue inversamente proporcional a la concentración del metal (figura 3a). A mayor cantidad del metal menos descenso de la absorbancia se obtuvo. A 0,05M (la mayor concentración usada) de plomo presente en la solución de lisozima incubada durante 4 horas se observó que el descenso de la absorbancia fue leve. Después de 12 horas de incubación de lisozima en plomo (0,05 M) el descenso de absorbancia medida a 450 nm es menor que los ensayos realizados a 4 horas (figura 3b). La figura 3c nos muestra que a mayor tiempo (24 horas) de incubación de la enzima (lisozima) con el metal, mayor fue la pérdida de su actividad.

En la figura 3d se puede ver que el descenso de la absorbancia al incluirlo en la fórmula de porcentaje de actividad enzimática (Ec. 2), nos refleja la actividad enzimática residual de la enzima (lisozima). Se puede determinar que la concentración de 0,05M de plomo la lisozima (enzima) solo conserva un 43% de su actividad enzimática después de las 4 horas de incubación, con lo que nos indica que ha perdido un 57% de su actividad, mientras que con la concentración de 0,01M de plomo, la lisozima conserva el 83 % de su actividad, perdiendo el 13% a causa de la presencia del metal. La pérdida de la actividad enzimática de la lisozima fue directamente proporcional a la concentración de metal (Pb).

A las 12 horas con la concentración más alta de plomo utilizada (0,05M), la lisozima conserva el 33% de la actividad enzimática, perdiendo el 67% de su actividad normal y a concentración menor (0,01M) de plomo, la lisozima tiene una actividad del 73% que representa la pérdida del 28% de actividad enzimática en el transcurso de 12 horas (figura 3d).

Inoculando la enzima (lisozima) a una concentración de 0,05M de plomo solo logró conservar un 19% de su actividad enzimática, lo cual nos indicó que perdió un 81% de su actividad enzimática natural para destruir las paredes de *Micrococcus* (sustrato), pero a 0,01M de plomo se conserva el 19% y pierde el 81% de su actividad a las 24 horas de inoculación.

Mientras mayor sea el tiempo de incubación de la enzima (lisozima) en plomo, mayor será afectada su actividad. Así también con la concentración de plomo, si la concentración es mayor, la actividad enzimática se reduce más.

Existen trabajos que demuestran que el plomo reduce la actividad algunas enzimas. En China se determinó que la actividad de la deshidrogenasa y la ureasa se ven afectada cuando hay presencia de plomo (Chen 2005). En Pakistán investigaron la actividad de la catalasa y fosfatasa en presencia de plomo, los resultados muestran que la enzima fue inhibida en casi su totalidad (Khan, Cao et al. 2007).

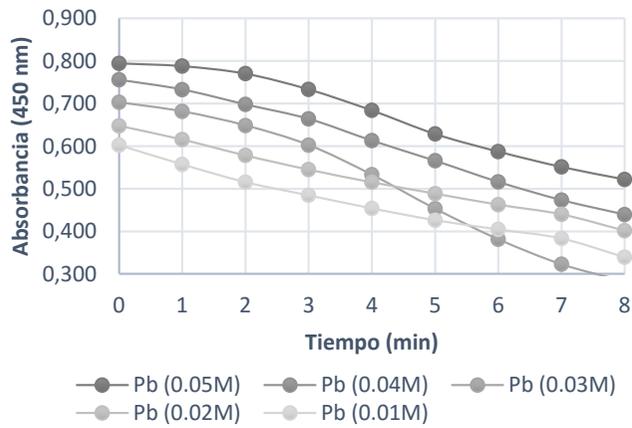


Figura 3a. Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en Pb por 4 horas a 450 nm.

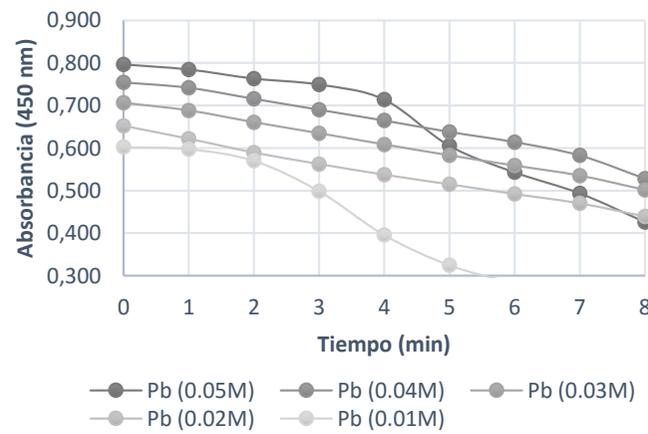


Figura 3b. Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en Pb por 12 horas a 450 nm.

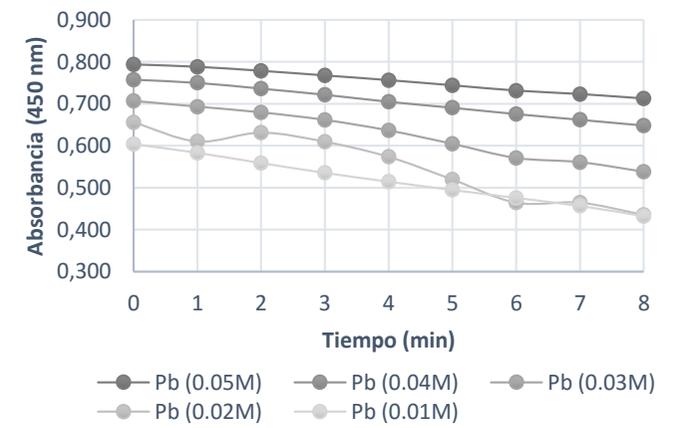


Figura 3c. Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en Pb por 24 horas a 450 nm.

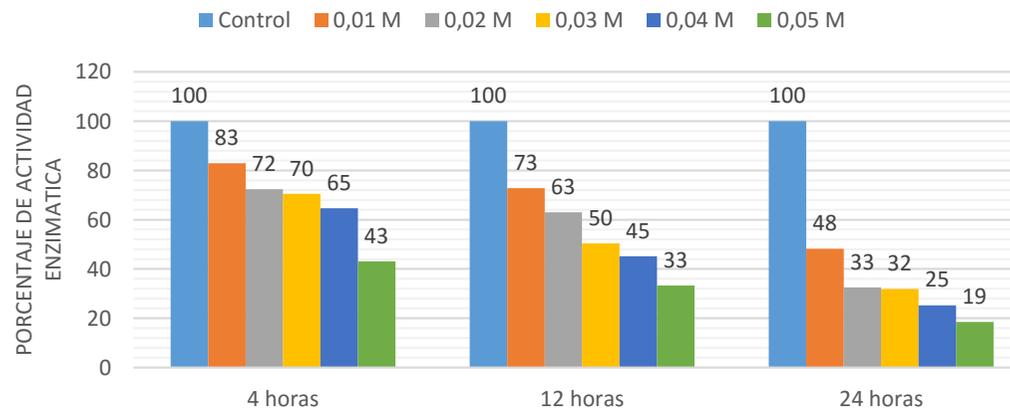


Figura 3d. Porcentaje de actividad enzimática de lisozima nativa comparada con lisozima incubada con Pb durante distintos tiempos de incubación.

4.1.2.3. Análisis de Níquel

A diferentes concentraciones de Níquel [0,01M; 0,02M; 0,03M; 0,04M y 0,05M] fue sometida la lisozima (enzima), la misma que fue utilizada en una solución de *Micrococcus* donde se midió el descenso de la absorbancia a 450 nm durante ocho minutos. Los ensayos fueron realizados por triplicado. En los resultados de gráficos (figura 4a, 4b y 4c) se expresa la media de las tres medidas obtenidas. Previo a la medida la solución de lisozima fue incubado con el níquel durante 4, 12 y 24 horas.

La lisozima incubada durante 4 horas con níquel indicó que el descenso de la absorbancia fue inversamente proporcional a la concentración del metal (figura 4a). A mayor cantidad del metal menos descenso de la absorbancia se consiguió. Después de 12 horas de incubación de la lisozima en níquel el descenso de absorbancia a 450 nm es menor que los ensayos realizados a 4 horas (figura 4b). Se puede observar en la figura 4c que a mayor tiempo de incubación de la enzima (lisozima) con el metal, mayor fue la pérdida de su actividad.

Con una concentración de 0,05M de níquel presente en la solución de lisozima incubada durante 4 horas se obtuvo que el descenso de la absorbancia fue menor que el de la enzima natural. En la figura 4d se puede ver que dicho descenso al incluirlo en la fórmula (Ec.2) del porcentaje de actividad enzimática, refleja la actividad enzimática residual de la enzima (lisozima). Se puede calcular que la concentración de 0,05M de níquel la lisozima (enzima) solo mantiene un 32% de su actividad enzimática después de las 4 horas de incubación, con lo que nos indica que ha perdido un 68% de su actividad, mientras que con la concentración de 0,01M de níquel, la lisozima conserva el 75% de su actividad, perdiendo el 25% a causa de la presencia del metal. La pérdida de la actividad enzimática de la lisozima fue directamente proporcional a la concentración de metal (Ni).

En tiempo de 12 horas con la concentración más alta de níquel utilizada (0,05M), la lisozima conserva el 15% de la actividad enzimática, perdiendo el 85% de su actividad normal y a concentración menor (0,01M) de níquel, la lisozima tiene una actividad del 52% que representa la pérdida del 48% de actividad enzimática en el transcurso de 12 horas (figura 4d).

Incubando la enzima (lisozima) a una concentración de 0,05M de níquel durante 24 horas solo logró conservar un 17% de su actividad enzimática, lo cual nos indicó que perdió un 83% de su actividad enzimática natural para destruir las paredes de *Micrococcus* (sustrato), pero a 0,01M de níquel se conserva el 21% y pierde el 79% de su actividad a las 24 horas de inoculación.

Esto nos indica que mientras mayor sea el tiempo de incubación de la enzima (lisozima) en níquel, mayor será afectada su actividad. Así también con la concentración de níquel, si la concentración es mayor, la actividad enzimática se reduce más.

Hay estudios que demuestran que el Níquel afecta la actividad de diversas enzimas. En Japón concluyeron que el níquel influye en algunas enzimas del páncreas de ratón, en concentración de 5 mg Ni / kg aumento la actividad de la tripsina y disminuyo la actividad de la carboxipeptidasa A, pero no afectó a la quimotripsina, carboxipeptidasa B, amilasa y lipasa. (Funakoshi, Kuromatsu et al. 1996). En Italia se mostró que el Níquel afecta la actividad de la deshidrogenasa de glucosa 6-fosfato, deshidrogenasa de glutamato, deshidrogenasa de isocitrato y la enzima málica. (Mattioni, Gabbrielli et al. 1997).

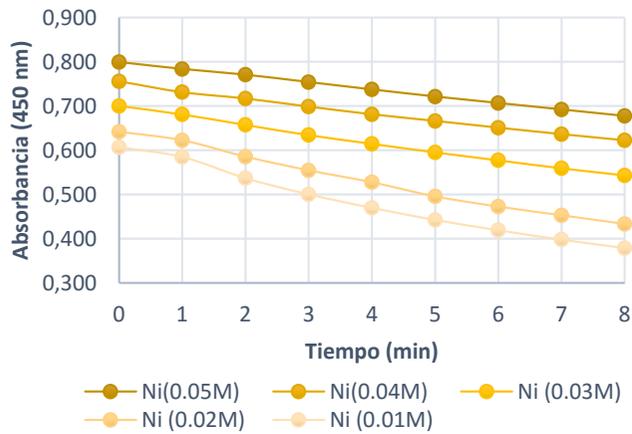


Figura 4a. Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en Ni por 4 horas a 450 nm.

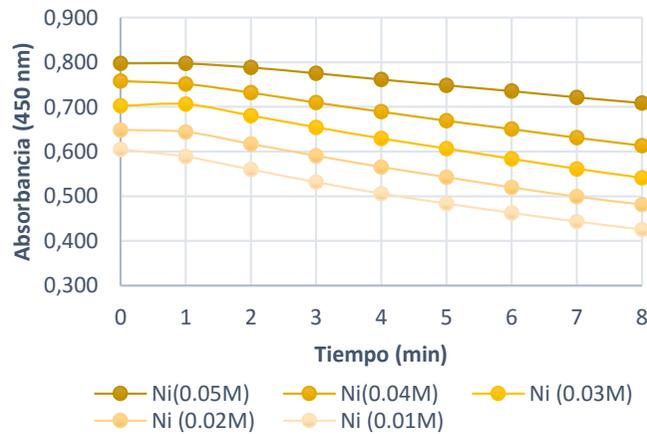


Figura 4b. Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en Ni por 12 horas a 450 nm.

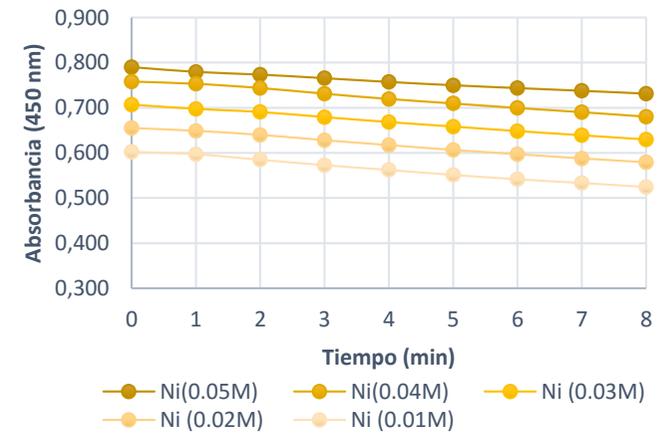


Figura 4c. Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en Ni por 24 horas a 450 nm.

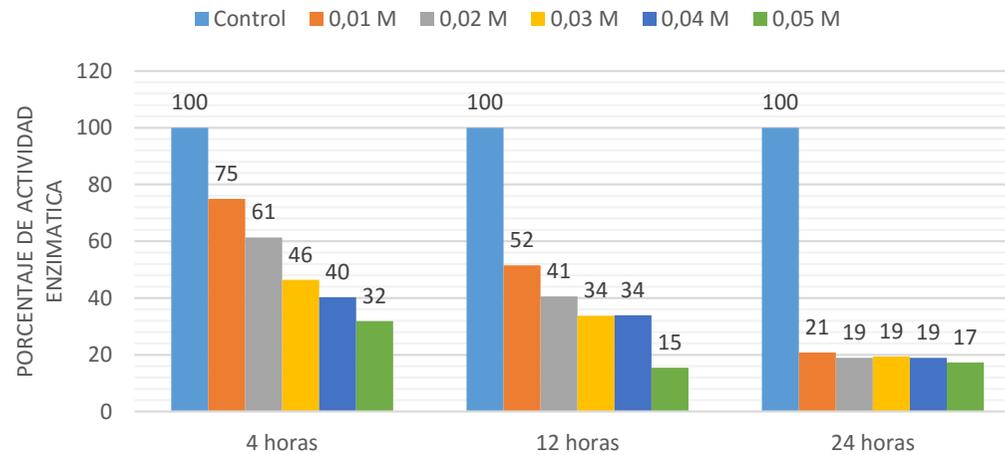


Figura 4d. Porcentaje de actividad enzimática de lisozima nativa comparada con lisozima incubada con Ni durante distintos tiempos de incubación.

4.1.2.4. Análisis de Boro

La solución de lisozima fue sometido a la presencia de Boro (B) a diferentes concentraciones 0,01M; 0,02M; 0,03M; 0,04M y 0,05M, la cual se añadió a una solución de *Micrococcus* y se midió el descenso de la absorbancia a 450 nm durante ocho minutos. Los ensayos fueron realizados por triplicados. En los resultados de gráficos (figura 5a, 5b y 5c) se expresa la media de las tres medidas obtenidas. Previo a la medida la solución de lisozima fue incubado con el boro durante 4, 12 y 24 horas.

En la figura 5a se puede observar que el descenso de la absorbancia fue inversamente proporcional a la concentración del metal. A mayor cantidad del metal menos descenso de la absorbancia se obtuvo. Además se pudo ver que a 0,05M (la mayor concentración) de boro presente en la solución de lisozima incubada durante 4 horas se observó que el descenso de la absorbancia fue leve. En el transcurso de 12 horas de incubación de lisozima en boro el descenso de absorbancia a 0,05M de concentración de B medida a 450 nm es menor que los ensayos realizados a 4 horas (figura 5b). En la figura 5c podemos observar que a mayor tiempo de incubación de la enzima (lisozima) con el metal, mayor fue la pérdida de su actividad.

En la figura 5d se puede ver que dicho descenso al incluirlo en la fórmula de porcentaje de actividad enzimática (Ec. 2) refleja la actividad enzimática residual de la enzima (lisozima). Se puede determinar que la concentración de 0,05M de boro la lisozima (enzima) solo conserva un 32% de su actividad enzimática después de las 4 horas de incubación, con lo que nos indica que ha perdido un 68% de su actividad, mientras que con la concentración de 0,01M de boro, la lisozima conserva el 97% de su actividad, perdiendo el 3% a causa de la presencia del metal. La pérdida de la actividad enzimática de la lisozima fue directamente proporcional a la concentración de metal (B).

Con la concentración más alta de boro utilizada (0,05M) durante 12 horas, la lisozima conserva el 33% de la actividad enzimática, perdiendo el 67% de su actividad normal y a concentración menor (0,01M) de boro, la lisozima tiene una actividad del 83% que representa la pérdida del 17% de actividad enzimática en el transcurso de 12 horas (figura 5d).

Inoculando la enzima (lisozima) a una concentración de 0,05M de boro durante 24 horas solo logró conservar un 14% de su actividad enzimática, lo cual nos indicó que perdió un 86% de su actividad enzimática natural para destruir las paredes de *Micrococcus* (sustrato), pero a 0,01M de boro se conserva el 48% y pierde el 52% de su actividad a las 24 horas de inoculación.

Esto nos indica que mientras mayor sea el tiempo de incubación de la enzima (lisozima) en boro, mayor será afectada su actividad. Así también con la concentración de boro, si la concentración es mayor, la actividad enzimática se reduce más.

Algunos estudios han sido realizados sobre la actividad de enzimas en presencia de Boro. Hunt determino que el boro regula la actividad enzimática de proteasas, concluyendo que tiene un papel importante en la dieta de animales superiores y de los seres humanos (Hunt 1998). En el año 2011 se llevó a cabo una investigación que trajo como resultados que el boro afecta la actividad antioxidante de ciertas enzimas de las plantas (Keleş, Ergün et al. 2011).

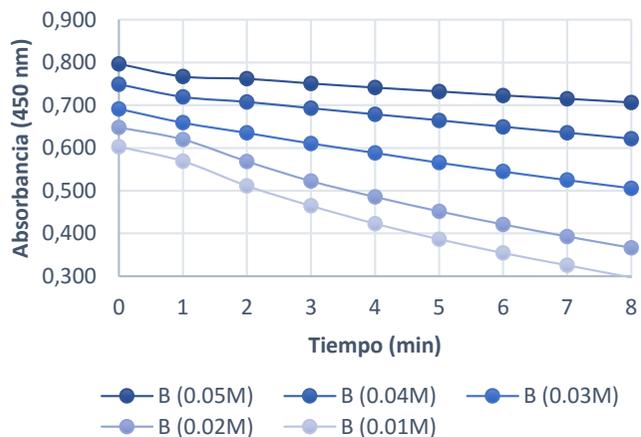


Figura 5a. Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en B por 4 horas a 450 nm.

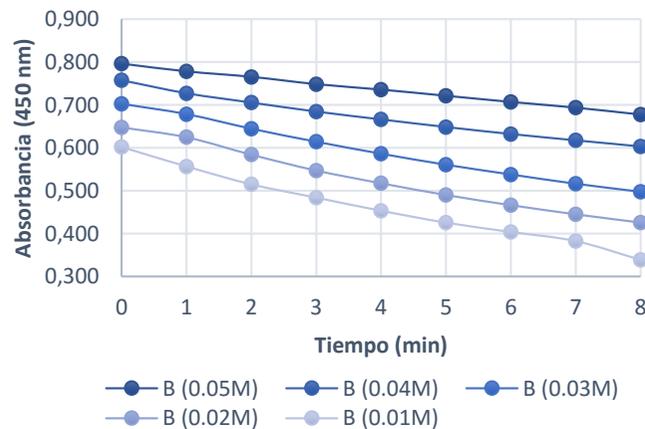


Figura 5b. Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en B por 12 horas a 450 nm.

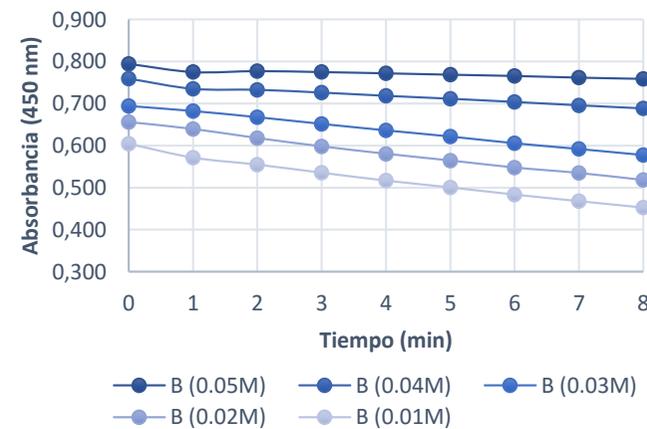


Figura 5c. Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en B por 24 horas a 450 nm.

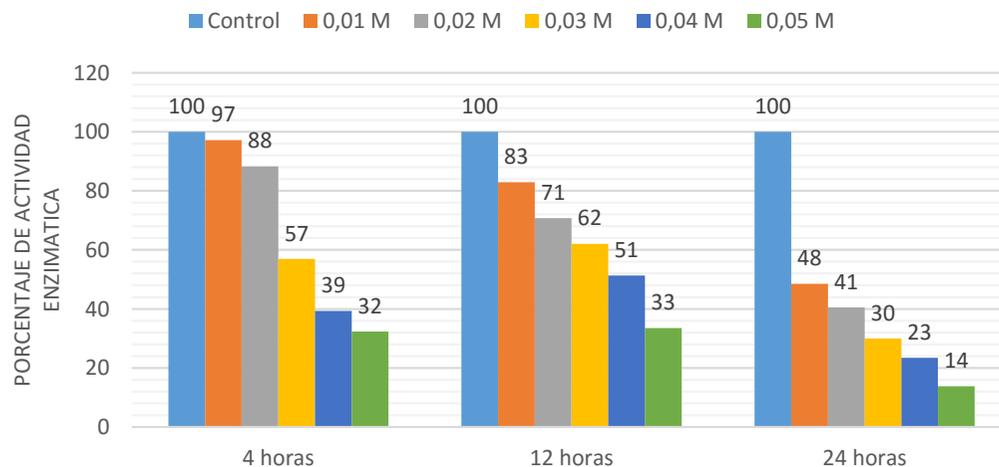


Figura 5d. Porcentaje de actividad enzimática de lisozima nativa comparada con lisozima incubada con B durante distintos tiempos de incubación.

4.1.2.5. Análisis de Cadmio

La lisozima fue sometida a la presencia de Cadmio (Cd) a diferentes concentraciones 0,01M; 0,02M; 0,03M; 0,04M y 0,05M; la enzima fue utilizada en la solución de *Micrococcus* donde se midió el descenso de la absorbancia a 450 nm durante ocho minutos. Los ensayos fueron realizados por triplicados. En los resultados de gráficos (figura 6a, 6b y 6c) se expresa la media de las tres medidas obtenidas. Previo a la medida la solución de lisozima fue incubado con el cadmio durante 4, 12 y 24 horas.

El ensayo de lisozima incubada durante 4 horas con cadmio demostró que el descenso de la absorbancia fue inversamente proporcional a la concentración del metal (figura 6a). A mayor cantidad del metal menos descenso de la absorbancia se obtuvo. A 0,05M (la mayor concentración) de cadmio presente en la solución de lisozima incubada durante 4 horas se observó que el descenso de la absorbancia fue leve. Después de 12 horas de incubación de lisozima en cadmio el descenso de absorbancia a 0,05M de concentración de Cd medida a 450 nm es menor que los ensayos realizados a 4 horas (figura 6b). La figura 6c nos muestra que a mayor tiempo de incubación de la enzima (lisozima) con el metal, mayor fue la pérdida de su actividad.

En la figura 6d se puede ver que dicho descenso al incluirlo en la fórmula de porcentaje de actividad enzimática (Ec. 2) refleja la actividad enzimática residual de la enzima (lisozima). Se puede determinar que la concentración de 0,05M de cadmio la lisozima (enzima) solo conserva un 25% de su actividad enzimática después de las 4 horas de incubación, con lo que nos indica que ha perdido un 75% de su actividad, mientras que con la concentración de 0,01M de cadmio, la lisozima conserva el 44% de su actividad, perdiendo el 56% a causa de la presencia del metal. La pérdida de la actividad enzimática de la lisozima fue directamente proporcional a la concentración de metal (Cd).

Después de 12 horas con la concentración más alta de cadmio utilizada (0,05M), la lisozima conserva el 15% de la actividad enzimática, perdiendo el 85% de su actividad normal y a concentración menor (0,01M) de cadmio, la lisozima tiene una actividad del 40% que representa la pérdida del 60% de actividad enzimática en el transcurso de 12 horas (figura 6d).

Inoculando la enzima (lisozima) a una concentración de 0,05M de cadmio durante 24 horas solo logró conservar un 7% de su actividad enzimática, lo cual nos indicó que perdió un 93% de su actividad enzimática natural para destruir las paredes de *Micrococcus* (sustrato), pero a 0,01M de cadmio se conserva el 37% y pierde el 63% de su actividad a las 24 horas de inoculación.

Mientras mayor sea el tiempo de incubación de la enzima (lisozima) en cadmio, mayor será afectada su actividad. Así también con la concentración de cadmio, si la concentración es mayor, la actividad enzimática se reduce más.

El cadmio se ha estudiado en varios países, y se ha demostrado que afecta la actividad de enzimas. Khan concluye que el Cadmio tiene un poder inhibitorio sobre la actividad de enzimas en suelos, entre las que incluyen catalasa, fosfatasa alcalina y deshidrogenasa. A mayor concentración de metal mayor era el efecto de inhibición de la enzima (Khan, Cao et al. 2007). Mientras que por su lado Sarosiek y colaboradores inhibieron eficazmente la actividad de la fosfatasa ácida mediante la aplicación de cadmio, y la actividad de la deshidrogenasa láctica se vio parcialmente afectada por este metal (Sarosiek, Pietruszewicz et al. 2009).

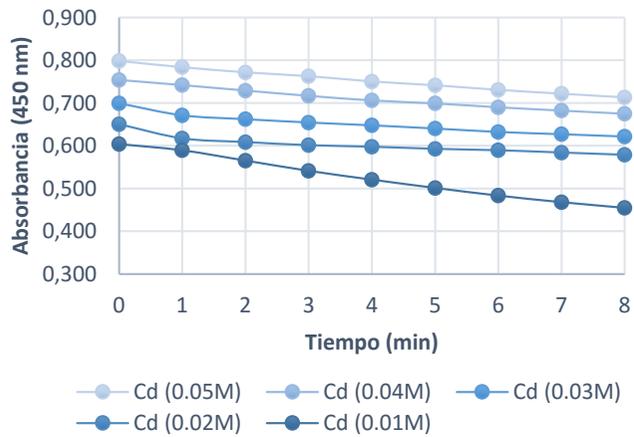


Figura 6a. Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en Cd por 4 horas a 450 nm.

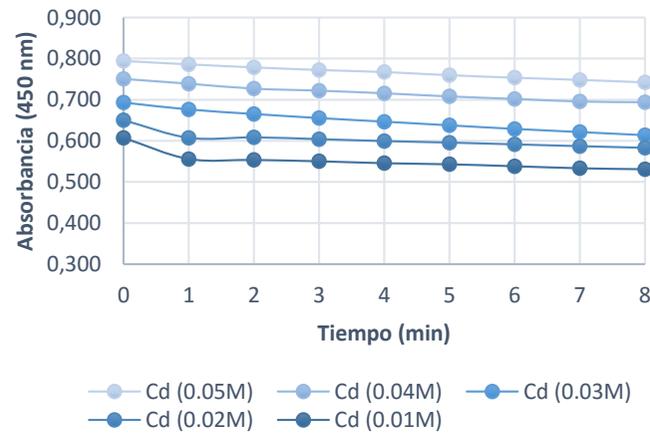


Figura 6b. Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en Cd por 12 horas a 450 nm.

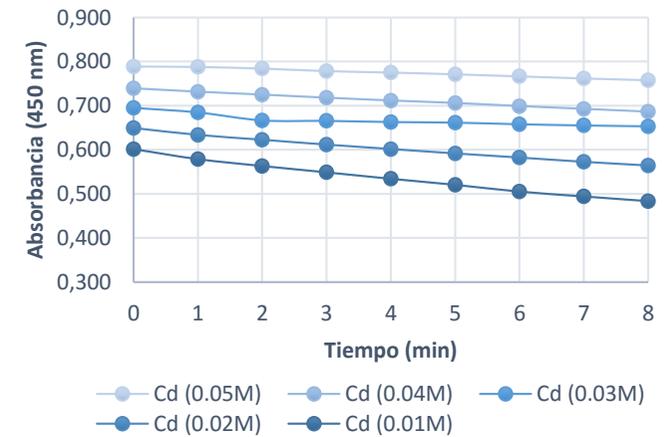


Figura 6c. Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en Cd por 24 horas a 450 nm.

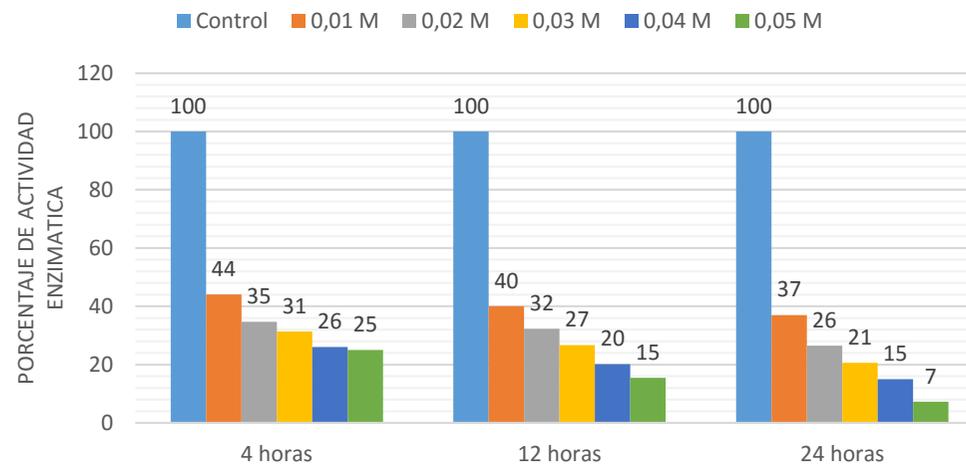


Figura 6d. Porcentaje de actividad enzimática de lisozima nativa comparada con lisozima incubada con Cd durante distintos tiempos de incubación.

4.1.2.6. Análisis de Cromo III

A diferentes concentraciones presencia de Cromo (III), al igual q los anteriores ensayos se utilizó diferentes concentraciones 0,01M; 0,02M; 0,03M; 0,04M y 0,05M; la enzima fue utilizada en la solución de *Micrococcus* donde se midió el descenso de la absorbancia a 450 nm durante ocho minutos. Los ensayos fueron realizados por triplicados. En los resultados de gráficos (figura 6a, 6b y 6c) se expresa la media de las tres medidas obtenidas. Previo a la medida la solución de lisozima fue incubado con el cadmio durante 4,12 y 24 horas.

El ensayo de lisozima incubada durante 4 horas con cromo (III) demostró que el descenso de la absorbancia sigue el comportamiento de los otros metales estudiados, fue inversamente proporcional a la concentración del metal (figura 7a), A mayor cantidad del metal menos descenso de la absorbancia se obtuvo. Con una concentración de 0,05M (la mayor concentración) de cromo (III) presente en la solución de lisozima incubada durante 4 horas se observó que el descenso de la absorbancia fue leve. Después de 12 horas de incubación de lisozima en cromo (III) el descenso de absorbancia a 0,05M de concentración de Cr III medida a 450 nm es menor que los ensayos realizados a 4 horas (figura 7b). Se puede observar en la figura 7c que a mayor tiempo de incubación de la enzima (lisozima) con el metal, mayor fue la pérdida de su actividad.

En la figura 7d se puede ver que dicho descenso al incluirlo en la fórmula (Ec.2) del porcentaje de actividad enzimática, refleja la actividad enzimática residual de la enzima (lisozima). Se puede calcular que la concentración de 0,05M de cromo (III) la lisozima (enzima) solo conserva un 28% de su actividad enzimática después de las 4 horas de incubación, con lo que nos indica que ha perdido un 72% de su actividad, mientras que con la concentración de 0,01M de cromo (III), la lisozima conserva el 58% de su actividad, perdiendo el 42% a causa de la presencia del metal. La pérdida de la actividad enzimática de la lisozima fue directamente proporcional a la concentración de metal (Cr III).

Después de 12 horas de incubación con la concentración más alta de cromo (III) utilizada (0,05M), la lisozima conserva el 17% de la actividad enzimática, perdiendo el 83% de su actividad normal y a concentración menor (0,01M) de cromo (III), la lisozima tiene una actividad del 51% que representa la pérdida del 49% de actividad enzimática en el transcurso de 12 horas (figura 7d).

Inoculando la enzima (lisozima) a una concentración de 0,05M de cromo (III) durante 24 horas solo logró conservar un 1% de su actividad enzimática, lo cual nos indicó que perdió un 99% de su actividad enzimática natural para destruir las paredes de *Micrococcus* (sustrato), pero a 0,01M de cromo (III) se conserva el 49% y pierde el 51% de su actividad a las 24 horas de inoculación.

Esto muestra que mientras mayor sea el tiempo de incubación de la enzima (lisozima) en cromo (III), mayor será afectada su actividad. Así también con la concentración de cromo (III), si la concentración es mayor, la actividad enzimática se reduce más.

Existen trabajos que demuestran que el Cromo con valencia 3 afecta la actividad de ciertas enzimas. En India se determinó que la esterase bobina es afectada por la presencia de cromo (III) (Raja, Shrivastava et al. 2011). En estudios realizados con aldolasa y catalasa también demostraron que pierden su activan al tener contacto con cromo (III) (Scharf, Clement et al. 2014).

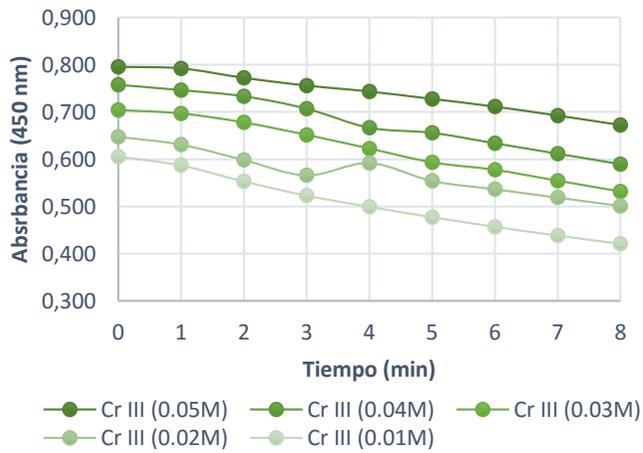


Figura 7a. Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en Cr III por 4 horas a 450 nm.

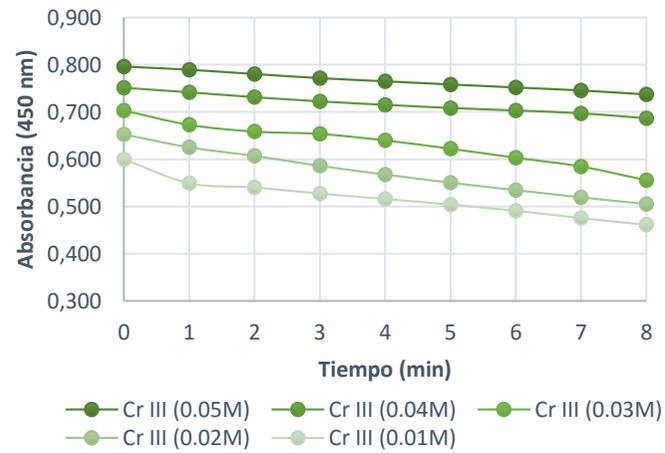


Figura 7b. Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en Cr III por 12 horas a 450 nm.

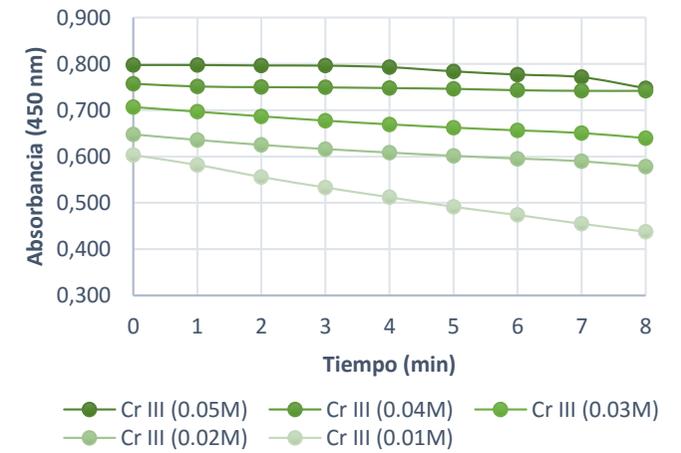


Figura 7c. Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en Cr III por 24 horas a 450 nm.

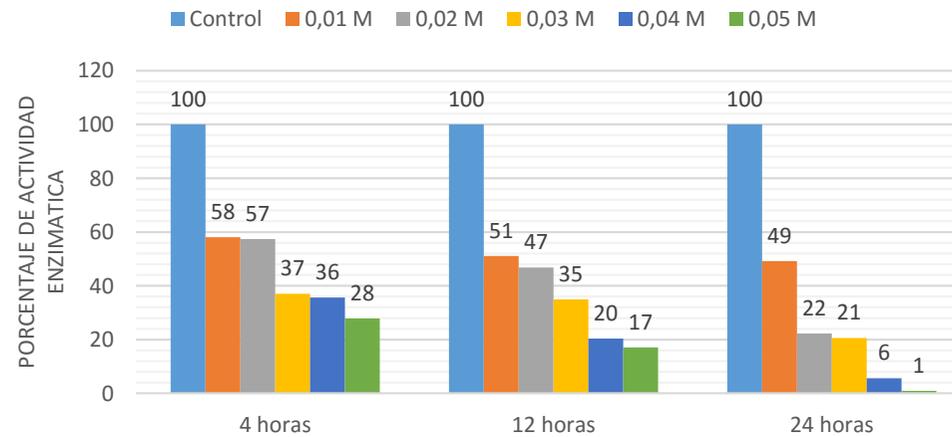


Figura 7d. Porcentaje de actividad enzimática de lisozima nativa comparada con lisozima incubada con Cr III durante distintos tiempos de incubación.

4.1.2.7. Análisis de Cromo VI

A diferentes concentraciones presencia de Cromo (VI), al igual q los anteriores ensayos se utilizó diferentes concentraciones 0,01M; 0,02M; 0,03M; 0,04M y 0,05M; la enzima fue utilizada en la solución de *Micrococcus* donde se midió el descenso de la absorbancia a 450 nm durante ocho minutos. Los ensayos fueron realizados por triplicados. En los resultados de gráficos (figura 8a, 8b y 8c) se expresa la media de las tres medidas obtenidas. Previo a la medida la solución de lisozima fue incubado con el cromo VI durante 4,12 y 24 horas.

El ensayo de lisozima incubada durante 4 horas con cromo (VI) mostró que el descenso fue inversamente proporcional a la concentración del metal (figura 8a), A mayor cantidad del metal menor fue el descenso de la absorbancia. A 0,05M (mayor concentración) de Cr VI presente en la solución de lisozima incubada durante 4 horas se observó que el descenso de la absorbancia se redujo en una gran proporción, la figura 8a no presenta mayor tendencia del descenso. En el transcurso de 12 horas de incubación de lisozima en Cr VI el descenso de absorbancia a 0,05M de concentración de metal medida a 450 nm es menor que los ensayos realizados a 4 horas (figura 8b). En la figura 8c podemos observar que a mayor tiempo de incubación de la enzima (lisozima) con el metal, mayor fue la pérdida de su actividad.

En la figura 8d se puede ver que dicho descenso al incluirlo en la fórmula de porcentaje de Actividad Enzimática (Ec. 2) refleja la actividad enzimática residual de la enzima (lisozima). Se puede determinar que la concentración de 0,05M de cromo (VI) la lisozima (enzima) solo conserva un 14% de su actividad enzimática después de las 4 horas de incubación, con lo que nos indica que ha perdido un 86% de su actividad, mientras que con la concentración de 0,01M de cromo (VI), la lisozima conserva el 27% de su actividad, perdiendo el 73% a causa de la presencia del metal. La pérdida de la actividad enzimática de la lisozima fue directamente proporcional a la concentración de metal (Cr VI).

Con la concentración más alta de cromo (VI) utilizada (0,05M) y después de 12 horas de incubación, la lisozima conserva el 9% de la actividad enzimática, perdiendo el 91% de su actividad normal y a concentración menor (0,01M) de cromo (VI), la lisozima tiene una actividad del 22% que representa la pérdida del 78% de actividad enzimática en el transcurso de 12 horas (figura 8d).

Inoculando la enzima (lisozima) a una concentración de 0,05M de cromo (VI) durante 24 horas solo logró conservar un 3% de su actividad enzimática, lo cual nos indicó que perdió un 97% de su actividad enzimática natural para destruir las paredes de *Micrococcus* (sustrato), pero a 0,01M de cromo (VI) se conserva el 20% y pierde el 80% de su actividad a las 24 horas de inoculación (figura 8d).

Esto nos indica que a mayor tiempo de incubación de la enzima (lisozima) en cromo (VI), mayor será afectada su actividad. Así también, si la concentración de cromo (VI) es mayor, la actividad enzimática se reduce más.

Según investigaciones el Cromo (VI) afecta la actividad de distintas enzimas. Peng y colaboradores evaluaron diferentes concentraciones de Cr (VI) sobre la actividad de algunas enzimas de suelo, la deshidrogenasa fue afectada en mayor parte, la fosfatasa alcalina fue inhibida ligeramente, la catalasa no fue afectada por este metal, y la polifenol oxidasa fue estimulada en su actividad al estar en presencia de cromo (VI) (Peng, Huang et al. 2009). Por su parte Sandana y colaboradores demostraron que el Cromo (VI) modifica la actividad de la peroxidasa y reductasa (Sandana Mala, Sujatha et al. 2015).

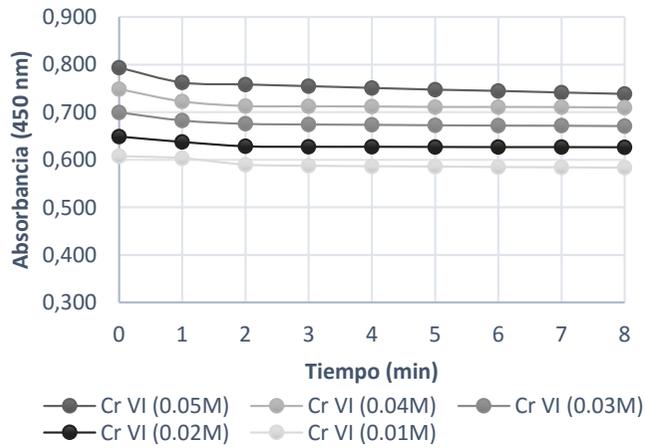


Figura 8a. Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en Cr VI por 4 horas a 450 nm.

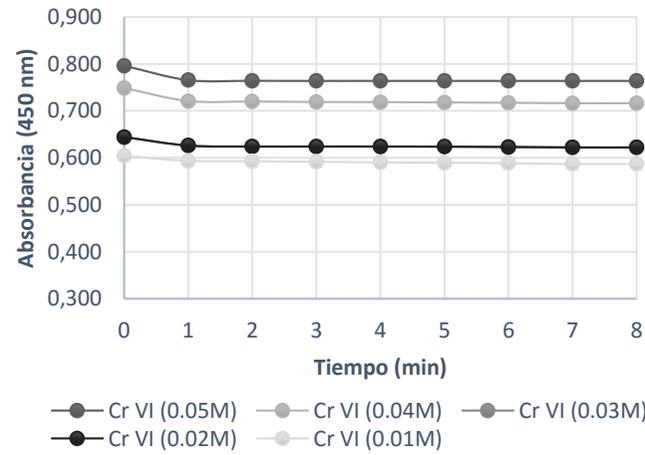


Figura 8b. Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en Cr VI por 12 horas a 450 nm.

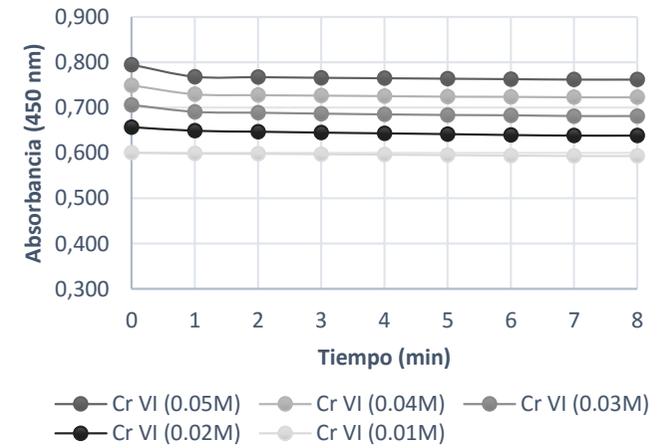


Figura 8c. Descenso de la Absorbancia de lisozima incubada en Cr VI por 24 horas a 450 nm.

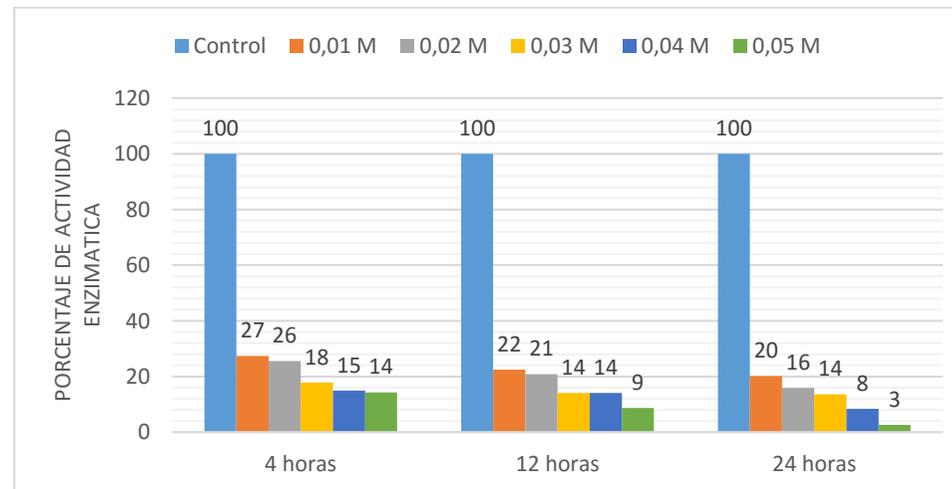


Figura 8d. Porcentaje de actividad enzimática de lisozima nativa comparada con lisozima incubada con Cr VI durante distintos tiempos de incubación.

Análisis estadístico de resultados.

Se realizó un análisis de varianza de tres factores AxBxC, obteniendo como resultado la siguiente tabla resumen.

Tabla 5. Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2,46	106	0,02	38,08	<0,0001
Replica	1,2E-03	2	5,8E-04	0,95	0,3879
Metal	1,28	6	0,21	350,30	<0,0001
Concentración	0,24	4	0,06	98,77	<0,0001
Tiempo de Incubación	0,39	2	0,19	319,55	<0,0001
Metal*Concentración	0,10	24	4,2E-03	6,94	<0,0001
Metal*Tiempo de Incubación..	0,16	12	0,01	22,54	<0,0001
Concentración*Tiempo de In..	0,02	8	2,4E-03	3,95	0,0002
Metal*Concentración*Tiempo..	0,26	48	0,01	8,96	<0,0001
Error	0,13	208	6,1E-04		
Total	2,59	314			

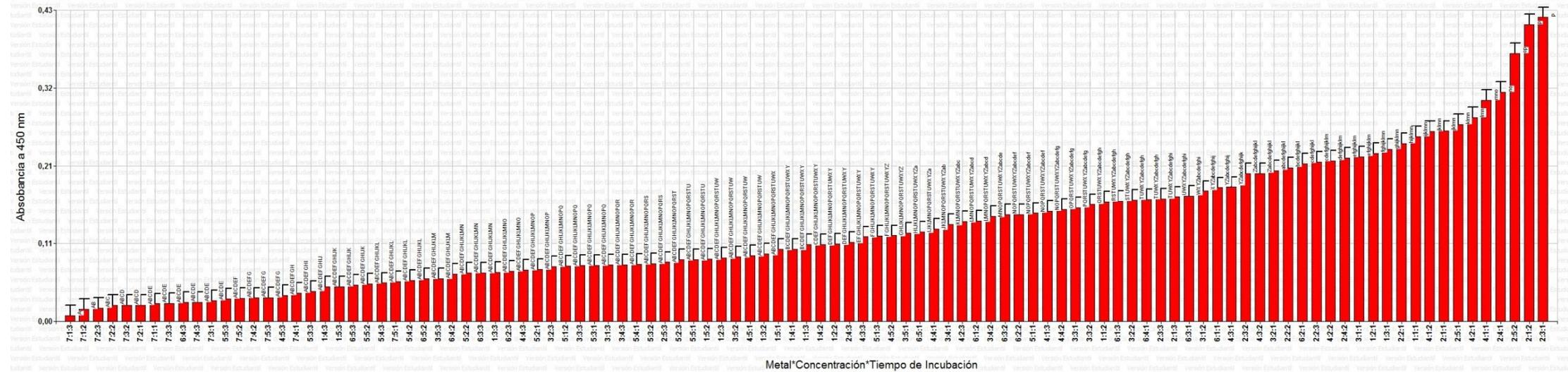
Fuente: Paquete estadístico Infostat - Student

Como conclusión se puede observar en la tabla 5 que a un nivel de confianza de 95% cada factor influye en el descenso de la absorbancia a 450 nm (obtenido en la determinación de la actividad enzimática de la lisozima de clara de huevo), así como también influye sus interacciones, es decir que el factor A (Metal), el factor B (Concentración) y factor C (Tiempo de Incubación) si interfieren estadísticamente en la actividad enzimática.

También se realizó una prueba tukey para determinar cuál tratamiento tiene mayor y menor influencia sobre la actividad enzimática, teniendo como resultado el siguiente gráfico.

Del que se puede concluir que los tratamientos de plomo con concentración 0,01M a 12 horas de incubación y plomo con concentración de 0,03M a 4 horas de incubación son los que menor influencia tienen sobre la lisozima, haciendo que el descenso de la absorbancia sea ligeramente menor al de la lisozima nativa, mientras que el tratamiento que contiene Cromo VI a concentración 0,01M por 24 horas de incubación tiene mayor influencia sobre la lisozima, inhibiendo su actividad casi en su totalidad.

Prueba de Comparación Tukey



Capítulo V

Conclusiones y Recomendaciones

5.1. Conclusiones

- Se evaluó la inhibición de la actividad enzimática de lisozima de clara de huevo de gallina mediante la aplicación de metales pesados, cada uno de ellos afectó en un grado diferente la actividad enzimática, siendo enlistados de mayor a menor grado de la siguiente manera: Cr VI, Cr III, Cd, B, Ni, Hg y Pb, así el Cr VI el metal que afectó en mayor grado y el Pb el que afectó en menor grado a la enzima.
- Se cuantificó el porcentaje de inhibición en cada uno de los tratamientos, logrando comparar los resultados de cada metal, teniendo en consideración que se aplicaron distintos tiempos de incubación y distintas concentraciones de metal. Por ejemplo, a las 24 horas de incubación con una concentración de metal de 0,05M se obtuvo una inactivación del 81% en Pb, 83% en Ni, 84% en Hg, 88% en B, 93% en Cd, 97% en Cr VI y 99% en Cr III.
- Se determinó que el metal que más afecta a la lisozima es el Cr VI en una concentración de 0,01M, dando un valor de enzima inactiva del 86% a las 4 horas de incubación, el 91% a las 12 horas y del 97% a las 24 horas. Si lo dejamos en términos de enzima activa sería 14% a las 4 horas, 9% a las 12 horas y 3% a las 24 horas.
- Se determinó la cantidad de metales presentes en huevos comprados en la ciudad de Ambato, teniendo como resultado Pb (0,242 ppm), Hg (0,054 ppm), Ni (0,016 ppm), B (0,002 ppm), Cd (0,002 ppm) y Cr (0,059 ppm). Cabe recalcar que solo se determinó los metales utilizados en la investigación, aún hay más metales que pueden estar presentes en huevos de gallina.

5.2. Recomendaciones

- Determinar más metales presentes en huevos de gallina y otros alimentos como Cobre (Cu), Zinc (Zn), Cobalto (Co), Hierro (Fe), Manganeseo (Mn) que han sido metales determinados en huevos en países como Egipto, Londres y Perú.
- Al determinar actividad enzimática por espectrofotometría es recomendable preparar la solución de paredes celulares de *Micrococcus lysodeikticus* minutos antes de la medición para evitar errores en la medición.
- Ya que existe un equipo de espectrofotometría de absorción atómica en los laboratorios de la Universidad Técnica de Ambato se podría estandarizar las curvas de calibración de los metales y realizar estudios posteriores en esta área.
- Estudiar si los piensos de animales contienen metales pesados.
- Investigar si los comederos usados para la alimentación de las aves son correctos.
- Indagar el contenido de metales pesados en los suelos de las granjas.

Bibliografía

- Almeida, E. (2013). "El daño que producen los metales pesados en la Salud."
- Alnuaimi, M. M., I. A. Saeed and S. Salman Ashraf (2013). Effect of Various Heavy Metals on the Enzymatic Activity of E. Coli Alkaline Phosphatase.
- Anderson, M. R. P. and V. C. Pascual (1999). Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas, Díaz de Santos.
- Armstrong, F. B., F. B. Armstrong and T. P. Bennett (1982). Bioquímica, Reverté.
- ATSDR (2016). "ToxFAQs™ - Boro (Boron)." Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- ATSDR (2016). "ToxFAQs™ - Cadmio (Cadmium)." Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- ATSDR (2016). "ToxFAQs™ - Cromo (Chromium)." Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- ATSDR (2016). "ToxFAQs™ - Mercurio (Azogue) (Mercury)." Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- ATSDR (2016). "ToxFAQs™ - Níquel (Nickel)." Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- ATSDR (2016). "ToxFAQs™ - Plomo (Lead)." Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Azza, M. K. S. a. H., M.R. Hegazy (2011). "Determination of Some Heavy Metals in Table Hen's Eggs." Journal of American Science.
- Bartolomé, B., A. García-Ruiz, P. J. Martín-Álvarez, A. J. Martínez-Rodríguez, M. V. Moreno-Arribas and E. Pueyo (2008). "Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine."
- Carrillo, W. (2013). "Lisozima: Actividad antibacteriana y alergenicidad." Revista SAN (Sociedad Agraria de Nutrición) 14.
- Carrillo, W., A. Garcia-Ruiz, I. Recio and M. V. Moreno-Arribas (2014). "Antibacterial activity of hen egg white lysozyme modified by heat and enzymatic treatments against oenological lactic acid bacteria and acetic acid bacteria." J Food Prot 77(10): 1732-1739.
- Carvalho, C. M. L. E.-H., Chew.; Seyed, Isaac Hashemy; Jun, Luş and Arne Holmgren (2008). "Inhibition of the Human Thioredoxin System A MOLECULAR MECHANISM OF MERCURY TOXICITY." The Journal of Biological Chemistry.
- Cegielska-Radziejewska, R., G. Lesnierowski and J. Kijowski (2009). "Antibacterial activity of hen egg white lysozyme modified by thermochemical technique." European Food Research and Technology 228(5): 841-845.
- Chen, C.-I. L., Min; Huang, Chang-yong (2005). "Effect of combined pollution by heavy metals on soil enzymatic activities in areas polluted by tailings from Pb-Zn-Ag mine." Journal of Environmental Sciences 17(4): 637-640.
- Cho, J. H., I. P. Fraser, K. Fukase, S. Kusumoto, Y. Fujimoto, G. L. Stahl and R. A. B. Ezekowitz (2005). "Human peptidoglycan recognition protein S is an effector of neutrophil-mediated innate immunity." Blood 106(7): 2551-2558.
- Delfini, C., M. Cersosimo, V. Del Prete, M. Strano, G. Gaetano, A. Pagliara and S. Ambro (2004). "Resistance screening essay of wine lactic acid bacteria on lysozyme: efficacy of lysozyme in unclarified grape musts." J Agric Food Chem 52(7): 1861-1866.
- Díaz, A. (2014). "Union Europea. Contenidos maximos en metales pesados en productos alimenticios - Revisión 2014." CATICE de Valencia.
- Donderski, W. S., Brzezinska M. (2005). "The Influence of Heavy Metals on the Activity of Chitinases Produced by Planktonic, Benthic and Epiphytic Bacteria." Polish Journal of Environmental Studies 14(6): 851-859.

Feng, D., Y. Teng, J. Wang and J. Wu (2016). "The Combined Effect of Cu, Zn and Pb on Enzyme Activities in Soil from the Vicinity of a Wellhead Protection Area." Soil and Sediment Contamination: An International Journal **25**(3): 279-295.

Funakoshi, T., K. Kuromatsu and S. Kojima (1996). "Effect of nickel on enzymatic activities in the mouse pancreas." Res Commun Mol Pathol Pharmacol **92**(2): 245-252.

González, E. S., Antonio (2015). "Determinación cuantitativa de plomo, cadmio y mercurio en huevos de gallina de venta en mercados populares del cono norte de Lima – Perú."

Gunnar, N. (2013). "Metales: Propiedades Químicas y Toxicidad." Enciclopedia Química **63**.

Hoppe, A. (2010). "Examination of egg white proteins and effects of high pressure on select physical and functional properties." Food Science Commons.

Hughey, V. L. and E. A. Johnson (1987). "Antimicrobial activity of lysozyme against bacteria involved in food spoilage and food-borne disease." Appl Environ Microbiol **53**(9): 2165-2170.

Hughey, V. L., P. A. Wilger and E. A. Johnson (1989). "Antibacterial activity of hen egg white lysozyme against *Listeria monocytogenes* Scott A in foods." Appl Environ Microbiol **55**(3): 631-638.

Hunt, C. D. (1998). "Regulation of enzymatic activity: one possible role of dietary boron in higher animals and humans." Biol Trace Elem Res **66**(1-3): 205-225.

Ibrahim, H. R., T. Matsuzaki and T. Aoki (2001). "Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function." FEBS Letters **506**(1): 27-32.

IEH, I. d. E. d. H.-. (2009). "El gran libro del huevo."

Keleş, Y., N. Ergün and I. Öncel (2011). "Antioxidant Enzyme Activity Affected by High Boron Concentration in Sunflower and Tomato Seedlings." Communications in Soil Science and Plant Analysis **42**(2): 173-183.

Khan, S., Q. Cao, A. E.-L. Hesham, Y. Xia and J.-z. He (2007). "Soil enzymatic activities and microbial community structure with different application rates of Cd and Pb." Journal of Environmental Sciences **19**(7): 834-840.

Kozlov, L. V. V. M. L., T. N.; Batalova, V. A.; Gouzova, V. L.; D'yakov, and S. V. Romanov (2000). "Inhibition by an egg lysozyme of three stages of an enzymatic cascade of activation of a classic path of a human complement." Vestnik moskovskogo universiteta **41**: 88-90.

Krawczyński vel Krawczyk, T., M. Moszczyńska and M. Trojanowicz (2000). "Inhibitive determination of mercury and other metal ions by potentiometric urea biosensor." Biosensors and Bioelectronics **15**(11–12): 681-691.

Lee-Huang, S., P. L. Huang, Y. Sun, P. L. Huang, H.-f. Kung, D. L. Blithe and H.-C. Chen (1999). "Lysozyme and RNases as anti-HIV components in β -core preparations of human chorionic gonadotropin." Proceedings of the National Academy of Sciences **96**(6): 2678-2681.

Lesnierowski, G. and J. Kijowski (2007). Lysozyme. Bioactive Egg Compounds. R. Huopalahti, R. López-Fandiño, M. Anton and R. Schade. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 33-42.

Liu, H., F. Zheng, Q. Cao, B. Ren, L. Zhu, G. Striker and H. Vlassara (2006). "Amelioration of oxidant stress by the defensin lysozyme." Am J Physiol Endocrinol Metab **290**(5): E824-832.

Mattioni, C., R. Gabbrielli, J. Vangronsveld and H. Clijsters (1997). "Nickel and cadmium toxicity and enzymatic activity in nitolerant and non-tolerant populations of *Silene italica* Pers." Journal of Plant Physiology **150**(1): 173-177.

Mega, T. and S. Hase (1994). "Conversion of egg-white lysozyme to a lectin-like protein with agglutinating activity analogous to wheat germ agglutinin." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects **1200**(3): 331-333.

Mine, Y., F. Ma and S. Lauriau (2004). "Antimicrobial Peptides Released by Enzymatic Hydrolysis of Hen Egg White Lysozyme." Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**(5): 1088-1094.

Mohammadi, H., A. Amine, S. Cosnier and C. Mousty (2005). "Mercury–enzyme inhibition assays with an amperometric sucrose biosensor based on a trienzymatic-clay matrix." Analytica Chimica Acta **543**(1–2): 143-149.

Moldovan, L., B. A. Cheba, T. I. Zaghoul, M. H. El-Massry and A. R. El-Mahdy (2016). "9th International Conference Interdisciplinarity in Engineering, INTER-ENG 2015, 8-9 October 2015, Tirgu Mures, Romania Effect of Metal Ions, Chemical Agents, and Organic Solvent on Bacillus Sp.R2 Chitinase Activity." Procedia Technology **22**: 465-470.

Monge-Nájera, J., P. G. Figueroa and M. R. Rossi (2002). Biología General, Euned.

Niyonsaba, F. and H. Ogawa (2005). "Protective roles of the skin against infection: implication of naturally occurring human antimicrobial agents beta-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme." J Dermatol Sci **40**(3): 157-168.

OMS (2010). "Salud Ambiental y el Riesgo Volcánico." OMS.

Pattnaik, B. K. and S. M. Equeenuddin (2016). "Potentially toxic metal contamination and enzyme activities in soil around chromite mines at Sukinda Ultramafic Complex, India." Journal of Geochemical Exploration **168**: 127-136.

Pellegrini, A. (2003). "Antimicrobial peptides from food proteins." Curr Pharm Des **9**(16): 1225-1238.

Peng, B., S.-h. Huang, Z.-h. Yang, L.-y. Chai, Y.-z. Xu and C.-q. Su (2009). "Inhibitory effect of Cr(VI) on activities of soil enzymes." Journal of Central South University of Technology **16**(4): 594-598.

PGinstruments (2014). "AA500 Atomic Absorption Spectrometer."

Raja, N. S., H. Y. Shrivastava and B. U. Nair (2011). "Chromium(III) mediated conformational changes associated with alterations in the enzymatic activity of BSA: Influence of the coordinated ligand." NISCAIR-CSIR, India(Mar-2011): 531-538.

Ramezani, Z., N. Aghel and N. Amirabedin (2012). "Determination of Pb and Cd in Garlic Herb (*Allium sativum*) Planted in Gilan and Khuzestan Provinces Using Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry." Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products **7**(2): 41-44.

Romero Ledezma, K. P. (2009). "CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS." Revista Científica Ciencia Médica **12**: 45-46.

Samaranayake, Y. H., B. P. Cheung, N. Parahitiyawa, C. J. Seneviratne, J. Y. Yau, K. W. Yeung and L. P. Samaranayake (2009). "Synergistic activity of lysozyme and antifungal agents against *Candida albicans* biofilms on denture acrylic surfaces." Arch Oral Biol **54**(2): 115-126.

Sandana Mala, J. G., D. Sujatha and C. Rose (2015). "Inducible chromate reductase exhibiting extracellular activity in *Bacillus methylotrophicus* for chromium bioremediation." Microbiological Research **170**: 235-241.

Sarosiek, B., M. Pietruszewicz, J. Radziwoniuk and J. Glogowski (2009). "The effect of copper, zinc, mercury and cadmium on some sperm enzyme activities in the common carp (*Cyprinus carpio* L.)." Reprod Biol **9**(3): 295-301.

Sava, G. (1996). "Pharmacological aspects and therapeutic applications of lysozymes." Exs **75**: 433-449.

Scharf, B., C. C. Clement, V. Zolla, G. Perino, B. Yan, S. G. Elci, E. Purdue, S. Goldring, F. Macaluso, N. Cobelli, R. W. Vachet and L. Santambrogio (2014). "Molecular analysis of chromium and cobalt-related toxicity." Scientific Reports **4**: 5729.

Siddiqui, I., S. Nazam and F. A. Khan (2011). "Determination of some heavy metals in hen eggs using ICP-AES technique." Pak. J. Biochem. Mol Biol **44**: 133-136.

Sigma, A. (2013). "Enzymatic Assay of Lysozyme."

Sonni, F., M. J. Cejudo Bastante, F. Chinnici, N. Natali and C. Riponi (2009). "Replacement of sulfur dioxide by lysozyme and oenological tannins during fermentation: influence on volatile composition of white wines." Journal of the Science of Food and Agriculture **89**(4): 688-696.

Sunderman, J. W. (2013). "Metales: Propiedades Químicas y Toxicidad." Enciclopedia Química **63**.

Tenovuo, J. (2002). "Clinical applications of antimicrobial host proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in xerostomia: efficacy and safety." Oral Diseases **8**(1): 23-29.

Tirelli, A. and I. Denoni (2007). "Evaluation of lysozyme stability in young red wine and model systems by a validated HPLC method." Food Chemistry **105**(4): 1564-1570.

Valencia, G. (2016). "La contaminación atmosférica vista como una enfermedad."

VINOTEC (2013). "LISOVIN."

Wang, Y., J. Shi, H. Wang, Q. Lin, X. Chen and Y. Chen (2007). "The influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter." Ecotoxicology and Environmental Safety **67**(1): 75-81.

Weber, P., H. Steinhart and A. Paschke (2007). "Investigation of the Allergenic Potential of Wines Fined with Various Proteinogenic Fining Agents by ELISA." Journal of Agricultural and Food Chemistry **55**(8): 3127-3133.

Wyszkowska, J. and M. Wyszkowski (2003). "Effect of cadmium and magnesium on enzymatic activity in soil." Polish Journal of Environmental Studies **12**(4): 473-480.

You, S.-J., C. C. Udenigwe, R. E. Aluko and J. Wu (2010). "Multifunctional peptides from egg white lysozyme." Food Research International **43**(3): 848-855.