

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y
AGROINDUSTRIA**

**DISEÑO DE UN SISTEMA DE PURIFICACIÓN DE INHIBIDORES DE
PAPAÍNA, PROVENIENTES DE SEMILLAS DE AMARANTO,
ARVEJA, CHOCHO, FRÉJOL, QUINUA O SANGORACHE,
MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE AFINIDAD**

**PROYECTO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA
AGROINDUSTRIAL**

TANNYA ELIZABETH RUIZ TAPIA
tannya_rt@hotmail.com

DIRECTOR: ING. JUAN PATRICIO CASTILLO DOMÍNGUEZ, Ph. D.
patricio.castillo@epn.edu.ec

Quito, mayo 2017

© Escuela Politécnica Nacional (2017)
Reservados todos los derechos de reproducción

DECLARACIÓN

Yo, Tannya Elizabeth Ruiz Tapia, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Escuela Politécnica Nacional puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

Tannya Elizabeth Ruiz Tapia

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por la Srta. Tannya Elizabeth Ruiz Tapia, bajo mi supervisión.

Ing. Patricio Castillo, Ph.D.
DIRECTOR DE PROYECTO

AUSPICIO

La presente investigación contó con el auspicio financiero del proyecto semilla PIS 15-15 “Diseño de un sistema de purificación basado en la afinidad de inhibidores de papaína, pepsina o carboxipeptidasa A, provenientes de semillas de amaranto, arveja, chocho, fréjol, quinua o sangorache”, que se ejecutó en el Departamento de Ciencias Nucleares.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios y a la Virgencita por las bendiciones entregadas a mí y a mi familia, por darme la fuerza necesaria en momentos difíciles y por estar conmigo siempre.

A mis padres Germán y Cecilia, por todo el amor, por el esfuerzo y el sacrificio diario que hacen para que pueda superarme día a día. Gracias gorditos por ser mi mayor inspiración y mi motivación para salir adelante.

A la mejor persona con quien compartí esta etapa, quien estuvo a mi lado para festejar los triunfos, quien secó mis lágrimas en situaciones difíciles y quien creyó en mi capacidad en todo momento. Gracias Marco Vinicio por tu apoyo incondicional y por tu amor honesto.

A mi hermana Silvana y a su familia, por las manifestaciones de cariño, apoyo y afecto que siempre estuvieron presentes.

Al Doctor Patricio Castillo porque me dio la oportunidad de ser parte este proyecto, por su constante ayuda en el desarrollo de la investigación, por tener mucha paciencia con mi persona y por compartir sus conocimientos científicos.

Al Ingeniero José Velásquez del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, estación Santa Catalina por facilitarme la obtención de las semillas utilizadas en esta investigación.

Un profundo agradecimiento al Departamento de Ciencias Nucleares y sus colaboradores, que me enseñaron que las metas se alcanzan con esfuerzo, dedicación, paciencia y perseverancia. En especial a Paito, Gonza, Pauli, al Inge Marquito y a la Dra. Florinella, por su constante ayuda, supervisión y consejos en mi etapa de tesista y por ayudarme a solucionar muchas dudas durante mis experimentos.

Al Doctor Mauricio Mosquera del Departamento de Ciencias de Alimentos y Biotecnología (DECAB), por la capacitación y guía en electroforesis.

A todos mis amigos, amigas y muñekitas pues hicieron muy divertido este paso por la universidad. Agradezco con profundo cariño a Cristian, Karlita, Pau, Gorky, Luchito y Patylu por estar a mi lado en momentos buenos y malos, porque no solo tuvimos un vínculo académico sino una bonita amistad llena de buenos encuentros.

A los maestros de la Escuela Politécnica Nacional que pudieron impartir sus conocimientos, los cuales ahora serán la base de mi vida profesional. En especial, a las ingenieras Yadira Salguero y Cristina Sotomayor, por su confianza, cariño y motivación en los últimos ciclos de mi carrera.

Muchas gracias a mi familia y a aquellas personas que de una u otra manera me brindaron una ayuda cuando lo necesitaba.

DEDICATORIA

Sin el cariño y el apoyo de ustedes, el camino a esta meta pudo haber sido más difícil; dedico este trabajo con mucho amor a mis papis: Germán y Cecilia.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	PÁGINA
GLOSARIO	ix
NOMENCLATURA	x
RESUMEN	xi
INTRODUCCIÓN	xiii
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
1.1 Proteasas	1
1.1.1 Generalidades	1
1.1.2 Especificidad de unión proteolítica	1
1.1.3 Clasificación	2
1.1.4 Papaína	4
1.2 Inhibidores proteolíticos	6
1.3 Purificación de inhibidores proteolíticos	9
1.3.1 Ultrafiltración por exclusión de tamaño	9
1.3.2 Tratamiento calórico	10
1.3.3 Precipitación salina	10
1.3.4 Cromatografía de afinidad	11
1.4 Caracterización de inhibidores de proteasas	15
1.4.1 Caracterización cinética	15
1.4.2 Caracterización molecular	20
2. PARTE EXPERIMENTAL	22
2.1 Materiales y equipos	22
2.1.1 Materiales	22
2.1.2 Equipos	22
2.1.3 Reactivos	22
2.2 Selección del valor de pH de inmovilización de papaína	23
2.2.1 Activación y oxidación de la matriz de afinidad	23
2.2.2 Inmovilización de papaína en el soporte de glioxil-sepharosa 6B-CL	24
2.2.3 Diseño experimental	24

2.3	Evaluación del efecto del proceso de reducción con NaBH ₄ del producto inmovilizado	25
2.3.1	Inmovilización de papaína en glioxil-sepharosa para definir el mejor proceso de reducción	25
2.3.2	Diseño experimental	25
2.4	Purificación de las fracciones inhibidoras más activas de papaína	26
2.4.1	Obtención de extractos acuosos de las semillas	26
2.4.2	Selección de los extractos acuosos con actividad inhibidora sobre papaína	27
2.4.3	Purificación parcial de los inhibidores más activos de papaína	28
2.4.4	Purificación de los inhibidores más activos presentes en los extractos acuosos de las semillas mediante cromatografía de afinidad en una matriz de papaína-glioxil-sepharosa 6B-CL	28
2.4.5	Diseño de un sistema de purificación de los inhibidores más activos presentes en los extractos acuosos de las semillas	29
2.5	Caracterización cinética y molecular de las fracciones inhibidoras más activas de papaína	30
2.5.1	Caracterización cinética de las fracciones con los inhibidores más activos de papaína	30
2.5.2	Caracterización molecular de los inhibidores más activos de papaína	30
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
3.1	Selección del valor de pH de inmovilización de papaína	32
3.2	Evaluación del efecto del proceso de reducción con NaBH ₄	36
3.3	Purificación de las fracciones inhibidoras más activas de papaína	39
3.3.1	Obtención de extractos acuosos de las semillas	39
3.3.2	Selección de los extractos acuosos con actividad inhibidora sobre papaína	42
3.3.3	Purificación parcial de los inhibidores más activos de papaína	44
3.3.4	Purificación selectiva de las fracciones inhibidoras más activas de papaína mediante cromatografía de afinidad, en una matriz de papaína-glioxil-sepharosa	50
3.3.5	Diseño de un sistema de purificación de los inhibidores más activos presentes en los extractos acuosos de las semillas	57
3.4	Caracterización cinética y molecular de las fracciones inhibidoras más activas de papaína	60

3.4.1	Caracterización cinética de los inhibidores de papaína purificados selectivamente	60
3.4.2	Caracterización molecular de los inhibidores de papaína purificados selectivamente	66
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	69
4.1	Conclusiones	69
4.2	Recomendaciones	70
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
	ANEXOS	84

ÍNDICE DE TABLAS

		PÁGINA
Tabla 1.1	Variación de los parámetros cinéticos por el mecanismo de inhibición	19
Tabla 2.1	Tratamientos empleados para evaluar el proceso de reducción de papaína-glioxil-sepharosa con NaBH ₄	26
Tabla 3.1	% EI, % RAF, % AEI y AEE de papaína inmovilizada en glioxil-sepharosa según el pH de inmovilización	33
Tabla 3.2	Análisis de varianza para el % EI por pH de inmovilización	34
Tabla 3.3	Análisis de varianza para el % RAF por pH de inmovilización	35
Tabla 3.4	Análisis de varianza para el % AEI por pH de inmovilización	36
Tabla 3.5	Análisis de varianza para la AEE por pH de Inmovilización	36
Tabla 3.6	% RAF de papaína inmovilizada en glioxil-sepharosa en los diferentes tratamientos de reducción con NaBH ₄	37
Tabla 3.7	Análisis de varianza para el % RAF por proceso de reducción	37
Tabla 3.8	Porcentaje de grasa removida en cada semilla con 1-propanol como solvente	40
Tabla 3.9	Concentración de proteína soluble en cada extracto	41
Tabla 3.10	Actividad inhibidora y actividad inhibidora específica de los extractos frente a papaína, con p-NPA como sustrato	42
Tabla 3.11	Concentración de proteína, actividad inhibidora y actividad inhibidora específica de los extractos, semipurificados con tratamiento térmico	45
Tabla 3.12	Concentración de proteína, actividad inhibidora y actividad inhibidora específica del extracto acuoso de amaranto y semipurificado de fréjol, luego de la ultrafiltración a 10 kDa	47
Tabla 3.13	Concentración de proteína, actividad inhibidora y actividad inhibidora específica de los extractos semipurificados de amaranto y fréjol con precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄	49

Tabla 3.14	Etapas de purificación y grado de purificación para el extracto de amaranto	57
Tabla 3.15	Etapas de purificación y grado de purificación para el extracto de fréjol	58
Tabla 3.16	Actividad enzimática de papaína sin inhibidor y en presencia de los lotes I y II, a diferentes concentraciones de p-NPA	60
Tabla 3.17	Velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) y constante de Michaelis-Menten (K_m) para la papaína en ausencia y presencia de los lotes inhibidores I y II	62
Tabla 3.18	Actividad enzimática de papaína sin inhibidor y en presencia de los lotes III y IV, a diferentes concentraciones de p-NPA	63
Tabla 3.19	Velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) y constante de Michaelis-Menten (K_m) para la papaína en ausencia y presencia de los lotes inhibidores III y IV	65
Tabla AII.1	Masa de papaína en el filtrado y lavados de papaína-glioxil-sepharosa 6B-CL	90
Tabla AII.2	Densidad óptica a 405 nm en función del tiempo para diferentes fracciones	92
Tabla AIV.1	Concentración de proteína, actividad inhibidora, actividad inhibidora específica y grado de purificación, de las fracciones recolectadas en la cromatografía de afinidad del extracto de fréjol	100
Tabla AIV.2	Concentración de proteína, actividad inhibidora, actividad inhibidora específica y grado de purificación, de las fracciones recolectadas en la cromatografía de afinidad del extracto de amaranto	101
Tabla AV.1	Actividad enzimática de papaína sin inhibidor y en presencia del lote I, a diferentes concentraciones de p-NPA	102
Tabla AV.2	Velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) y constante de Michaelis-Menten (K_m) para la papaína sin inhibidor y con los lotes I, II, III y IV	104

ÍNDICE DE FIGURAS

		PÁGINA
Figura 1.1	Especificidad de enzimas proteolíticas	2
Figura 1.2	Mecanismo catalítico de enzimas proteolíticas	3
Figura 1.3	Sistema de cromatografía y principales elementos	11
Figura 1.4	Cinética Enzimática. Modelo de Michaelis-Menten	15
Figura 1.5	Gráfico de los dobles recíprocos de Lineweaver y Burk	17
Figura 1.6	Gráficos de los dobles recíprocos de inhibición a) competitiva, b) mixta y c) no competitiva	19
Figura 3.1	Concentración de proteína (mg/mL) en función del tiempo (min) a diferentes valores de pH de inmovilización	32
Figura 3.2	Gráfico de medias e intervalos LSD del proceso de reducción del producto inmovilizado sobre el porcentaje de retención de actividad funcional (% RAF)	38
Figura 3.3	Concentración de proteína del extracto semipurificado de fréjol vs. número de fracción recolectada en la cromatografía de afinidad	52
Figura 3.4	Actividad inhibidora del extracto semipurificado de fréjol vs. número de fracción recolectada en la cromatografía de afinidad	53
Figura 3.5	Actividad inhibidora específica del extracto semipurificado de fréjol vs. número de fracción recolectada en la cromatografía de afinidad	54
Figura 3.6	Concentración de proteína del extracto semipurificado de amaranto vs. número de fracción recolectada en la cromatografía de afinidad	55
Figura 3.7	Actividad inhibidora del extracto semipurificado de amaranto vs. número de fracción recolectada en la cromatografía de afinidad	55
Figura 3.8	Actividad inhibidora específica del extracto semipurificado de amaranto vs. número de fracción recolectada en la cromatografía de afinidad	56

Figura 3.9	Diagrama del sistema de purificación de inhibidores de papaína provenientes de semillas de A) fréjol y B) amaranto	59
Figura 3.10	Actividad enzimática de papaína sin inhibidor y con lotes I y II, a diferentes concentraciones de p-NPA	61
Figura 3.11	Gráficas de los dobles recíprocos para la papaína sin inhibidor y con los lotes inhibidores I y II	62
Figura 3.12	Actividad enzimática de papaína sin inhibidor y con lotes III y IV, a diferentes concentraciones de p-NPA	64
Figura 3.13	Gráficas de los dobles recíprocos para la papaína sin inhibidor y con los lotes inhibidores III y IV	65
Figura 3.14	Gel de electroforesis SDS-PAGE de los extractos crudos de amaranto y fréjol	66
Figura 3.15	Movilidad total de los lotes purificados de fréjol y amaranto y del estándar de proteínas	67
Figura 3.16	Curva de calibración del estándar de electroforesis	68
Figura AI.1	Esquema del proceso de activación y oxidación de sepharosa 6B-CL	85
Figura AI.2	Esquema del proceso de desengrasado de harinas	86
Figura AI.3	Esquema del proceso de obtención de los extractos acuosos de las semillas	87
Figura AII.1	Variación de la densidad óptica a 405 nm en función del tiempo para la papaína soluble	92
Figura AII.2	Variación de la densidad óptica a 405 nm en función del tiempo para el filtrado, lavado 1 con acetato, lavado 1 con tris-HCl y lavado 2 con acetato	93
Figura AV.1	Linealización del modelo de Michaelis-Menten mediante el método de Lineweaver-Burk para la papaína sin inhibidor y con el lote I	103

ÍNDICE DE ANEXOS

	PÁGINA
ANEXO I	
Diagramas de flujo de procesos	85
ANEXO II	
Determinación del porcentaje de enzima inmovilizada, del porcentaje de actividad enzimática inmovilizada, del porcentaje de retención de actividad funcional y de actividad enzimática específica	88
ANEXO III	
Ejemplo de cálculo de la actividad de papaína, actividad inhibidora, actividad inhibidora específica y grado de purificación	97
ANEXO IV	
Mediciones en la purificación de las fracciones más activas de papaína por cromatografía de afinidad	100
ANEXO V	
Ejemplo de cálculo de los parámetros cinéticos y de la constante de inhibición con las fracciones inhibidoras más activas de papaína	102

GLOSARIO

Bases de Schiff: son iminas producto de la reacción entre dos grupos amínicos o entre un grupo amínico con un carbonílico (Ravin, 2010, p. 82).

Catálisis enzimática: es el incremento espontáneo o alteración de la velocidad de una reacción química por intervención de una enzima, la misma que no aparece en el producto final (Voet y Voet, 2006, p. 313).

Centro catalítico: es la región en donde se unen a los sustratos para dar lugar a la catálisis, también se conoce como centro activo (Berg, Tymoczko y Stryer, 2007, p. 214).

Cromatografía: es un proceso físico que permite la separación de los componentes de una disolución móvil que atraviesa un lecho estacionario (Silva y García, 2006, p. 25). En la cromatografía de afinidad la separación de moléculas se da gracias a la unión específica de dichas moléculas en la fase estacionaria (Voet y Voet, 2006, p. 104).

Enlace covalente: es la unión química en la que dos átomos comparten electrones por la atracción con los núcleos de los dos átomos (Acuña, 2006, p. 10).

Matriz de afinidad: es el soporte que tiene grupos químicos reactivos capaces de ser activados o modificados para acoplar el ligando que, posteriormente, unirá moléculas de interés para purificar (Coelho et al., 2012, p. 56).

Nucléofilo: es una molécula aniónica (-) con pares de electrones sin compartir, que se puede unir covalentemente a un átomo de carbono. Se conoce también como base de Lewis (Acuña, 2006, p. 145).

NOMENCLATURA

A	Absorbancia
AE	Actividad enzimática o proteolítica
AEE	Actividad enzimática específica
AI	Actividad inhibidora
AIE	Actividad inhibidora específica
BApNA	N- α Benzoil L-arginina p-nitroanilida
DMF	Dimetil formamida
DO	Densidad óptica
IP	Inhibidores proteolíticos
Ki	Constante de inhibición
Km	Constante de Michaelis-Menten
PA	Papaína
p-NPA	Acetato de p-nitrofenilo
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TEMED	Tetrametiletilendiamina
U	Unidad enzimática
V _{máx}	Velocidad máxima
% AEI	Porcentaje de actividad enzimática inmovilizada
% EI	Porcentaje de enzima inmovilizada
% RAF	Porcentaje de retención de actividad funcional
[P]	Concentración de proteína
[S]	Concentración de sustrato
6B-CL	Reticulado de agarosa al 6 % (Sepharose Cross-Linked)

RESUMEN

En esta investigación se purificaron y caracterizaron extractos inhibidores de papaína, provenientes de semillas certificadas del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, INIAP (Santa Catalina).

En primer lugar, se inmovilizó papaína en un soporte de glioxil-sepharosa 6B-CL. Se estudió el efecto del pH de inmovilización y del proceso de reducción, con NaBH_4 , sobre el porcentaje de enzima inmovilizada, actividad enzimática inmovilizada, retención de actividad funcional y actividad enzimática específica.

Con un diseño experimental completamente al azar se evaluaron 4 niveles de pH de inmovilización (8, 9, 10 y 11). El proceso de inmovilización a pH 8 produjo el mayor valor de retención de actividad funcional (RAF), igual a $79,42 \pm 2,45$ %.

Para seleccionar el mejor proceso de reducción del producto inmovilizado se utilizó un diseño completamente al azar con tratamientos que combinaron la concentración de NaBH_4 en niveles de 5 y 10 mg/mL de gel y la forma de adición del reductor, ya sea agregado directamente o en solución refrigerada. El mejor tratamiento de reducción fue con 5 mg NaBH_4 /mL de gel, agregados en solución tampón; con el que se obtuvo un RAF de 80,67 %, a pH igual a 8.

En una segunda etapa se obtuvieron extractos de amaranto (*Amaranthus caudatus* L., var. I-Alegría), arveja (*Pisium sativum*, var. I-432-Lojanita), chocho (*Lupinus mutabilis*, var. I-450-Andino), fréjol (*Phaseolus vulgaris*, var. I-481-Rojo del valle), quinua (*Chenopodium quinoa*, var. I-Tunkanhuan) y sangorache (*Amaranthus hybridus* L.). La harina de cada semilla se desengrasó y se homogenizó con tampón fosfato a una concentración de 50 mM y pH 6. Se centrifugó la mezcla y el sobrenadante se ultrafiltró en una membrana de 50 kDa. Se determinó la actividad inhibidora de cada extracto acuoso frente a papaína con p-NPA como sustrato. Todos los extractos presentaron inhibición frente a papaína, a excepción del extracto proveniente de quinua.

Los extractos acuosos de amaranto y fréjol presentaron mayor actividad inhibidora específica de papaína con 0,297 y 0,259 mU/mg, respectivamente. Estos extractos fueron seleccionados para ser purificados parcialmente con tratamiento calórico a 60 °C por 30 min, ultrafiltración a 10 kDa o precipitación con sulfato de amonio.

Luego, las fracciones se purificaron por cromatografía de afinidad en el soporte de papaína-glioxil-sepharosa 6B-CL preparado en las condiciones seleccionadas en la primera etapa de esta investigación.

Se diseñó un sistema de purificación para el extracto crudo de amaranto comprendido con etapas de ultrafiltración centrífuga a 10 kDa, precipitación con sulfato de amonio (30-60 %) y cromatografía de afinidad, con las que se logró un grado de purificación de 1,38; 2,58 y 137,54, respectivamente. El sistema de purificación para el extracto crudo de fréjol contó con etapas de tratamiento calórico a 60 °C, ultrafiltración centrífuga a 10 kDa y cromatografía de afinidad, con las que se logró un grado de purificación de 1,38; 1,50 y 79,10 veces, respectivamente.

La caracterización cinética determinó la presencia de inhibidores competitivos en las fracciones purificadas de amaranto y de inhibidores no competitivos en las de fréjol. Además, mediante SDS-PAGE se estimó el peso molecular de las fracciones inhibidoras de papaína. Los inhibidores provenientes de amaranto tuvieron un peso molecular de 7,20 kDa con K_i de 0,872 μM y los de fréjol un peso molecular de 8,50 kDa con K_i igual a 0,058 μM .

INTRODUCCIÓN

Los inhibidores proteolíticos de plantas (IPP) son proteínas de pesos moleculares bajos (Robert, 2005) que actúan sobre las enzimas para restringir su actividad de catálisis. Estas moléculas se pueden extraer de semillas en etapa de germinación (Habib y Majid, 2007, p. 70). Los IPP tienen la capacidad de inhibir enzimas proteolíticas de procesos patogénicos, por lo cual la química fina enfoca su estudio para el desarrollo de nuevos fármacos (Robert, 2005).

Por su parte, las semillas de cereales y leguminosas producidas en el país, se han destinado únicamente para el consumo animal y humano; sin embargo, se ha comprobado que estos productos son fuentes de inhibidores proteolíticos (Jamal, Pandey, Singh y Khan, 2012; Muñoz, 2011, p. 39; Jácome, 2015, p. 60). Estas moléculas se pueden utilizar en la obtención de compuestos útiles para el tratamiento de trastornos provocados por un desequilibrio de proteasas fisiológicas, responsables de desórdenes metabólicos como la artritis, distrofia muscular, invasión tumoral, etc.; o de proteasas patógenas como la de la malaria (Quibell, Taylor, Grabawska, Nilsson y Morisson, 2006).

Para cualquier aplicación biotecnológica es necesario disponer de inhibidores altamente purificados y con elevada actividad biológica. La purificación de inhibidores proteolíticos de plantas (IPP) permite definir sus características estructurales y especificidad de unión a las proteasas (Gomes et al., 2005). Así, resulta importante aislar los IPP de las demás proteínas presentes en la misma fuente biológica; sin embargo, puede ser una tarea complicada debido a la diversidad molecular que presentan los inhibidores.

Un método de purificación es la cromatografía de afinidad, que aprovecha la capacidad de las proteínas para adherirse selectiva y reversiblemente a otras moléculas o ligandos, que se encuentran inmovilizadas sobre una matriz sólida (Turková, 1993, p. 9).

El estudio realizado por Jácome (2015) se enfocó en la obtención de inhibidores de proteasas a partir de semillas de gramíneas y fabáceas, se purificaron las fracciones inhibitoras más activas de quimotripsina, papaína y carboxipeptidasa A. Sin embargo, la purificación de los IPP se realizó mediante cromatografía de afinidad con un soporte de tripsina-glioxil-sepharosa. Esto provocó que los inhibidores de papaína tengan dificultad para adherirse y consecuentemente, su grado de purificación fue bajo.

Se ha demostrado que la purificación de IPP mejora con el uso de técnicas de cromatografía de afinidad, a través de un agente de unión con proteasas específicas, por esta razón y por los antecedentes mencionados, en la presente investigación se diseñó un sistema de purificación de inhibidores de papaína, provenientes de semillas de leguminosas o cereales de producción ecuatoriana, mediante cromatografía de afinidad con papaína inmovilizada covalentemente.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 PROTEASAS

1.1.1 GENERALIDADES

Las enzimas proteolíticas, también llamadas proteasas, proteinasas o peptidasas, son proteínas que hidrolizan irreversiblemente enlaces peptídicos en una secuencia de aminoácidos (Siklos, BenAissa y Thatcher, 2015, p. 506). Participan en la síntesis de proteínas por lo que tienen la capacidad de regular procesos fisiológicos, tales como la digestión, fertilización, crecimiento y desarrollo celular, diferenciación, defensa inmunológica, cicatrización de heridas y apoptosis (Leung, Abbenante y Fairlie, 2000, p. 305).

Gracias a su acción específica, las proteasas son consideradas moléculas de gran importancia pues están implicadas en varios procesos vitales (Feijoo y Villa, 2010, p. 1066). Además, constituyen el mayor grupo enzimático con diversas aplicaciones bioindustriales; así, por ejemplo, son utilizadas para el desarrollo de detergentes, alimentos y productos farmacéuticos, para la recuperación de metales y para el tratamiento de residuos industriales (Anshu, 2007, p. 11; Kalpana, Rasheedha, Gnanaprabhal, Pradeep y Palaniswa, 2008, p. 2).

1.1.2 ESPECIFICIDAD DE UNIÓN PROTEOLÍTICA

Las proteasas no atacan a todos los sustratos proteicos; al contrario, presentan un alto grado de especificidad. Esta especificidad no está definida únicamente por el sitio de catálisis, pues también hay influencia de los sitios de unión de los aminoácidos presentes en los sustratos (López y Overall, 2002, p. 516). Comúnmente, el sitio activo de las enzimas proteolíticas se encuentra en una ranura sobre la superficie de la molécula y la afinidad al sustrato se establece por las propiedades de los sitios de unión dispuestos a lo largo de la ranura en uno o

ambos lados del centro catalítico, responsable de hidrolizar el enlace peptídico (Barret, 2001, p. 1).

En la Figura 1.1 se presenta un bosquejo general de la afinidad de las proteasas un sustrato. Se observa que, a cada lado del centro catalítico existen sitios de unión (S) que se adhieren a aminoácidos particulares (P). De esta manera, se define la eficiencia en la catálisis enzimática (Barret, 2001, p. 2).

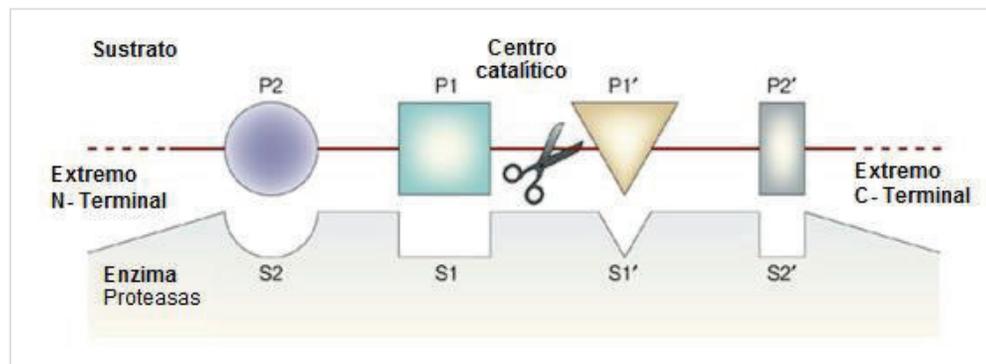


Figura 1.1 Especificidad de enzimas proteolíticas
(Barret, 2001, p. 2)

1.1.3 CLASIFICACIÓN

Según el tipo de reacción que catalizan, las enzimas se clasifican en: transferasas, liasas, isomerasas, oxidorreductasas, hidrolasas y ligasas (Voet y Voet, 2006, p. 484). Las proteasas se encuentran en el grupo de las hidrolasas (Siklos et al., 2015, p. 506). También, se puede clasificar a las proteasas según su origen en microbianas, vegetales, animales y humanas (Rao, Tanksale, Ghate y Despande, 1998, p. 598).

Según la base del sitio activo de acción sobre el sustrato, las enzimas proteolíticas pueden ser exopeptidasas o endopeptidasas. Las exopeptidasas se caracterizan por hidrolizar el enlace proximal peptídico del extremo amino terminal (aminopeptidasas) o carboxilo terminal (carboxipeptidasas) del sustrato; mientras

que, las endopeptidasas escinden enlaces peptídicos intermedios del sustrato (Rao, Tanksale, Ghate y Despande, 1998, p. 598; Turk, 2006, p. 785).

Finalmente, de acuerdo con el grupo catalítico presente en el sitio activo, las proteinasas pueden ser: serino (Ser), treonino (Thr), cisteíno (Cys), aspartato (Asp), glutamato (Glu) proteasas o metaloproteasas (Lecaille, Kaleta y Bromme, 2002, p. 4 459; Siklos et al., 2015, p. 506). En la Figura 1.2 se observan los mecanismos catalíticos de las principales proteasas.

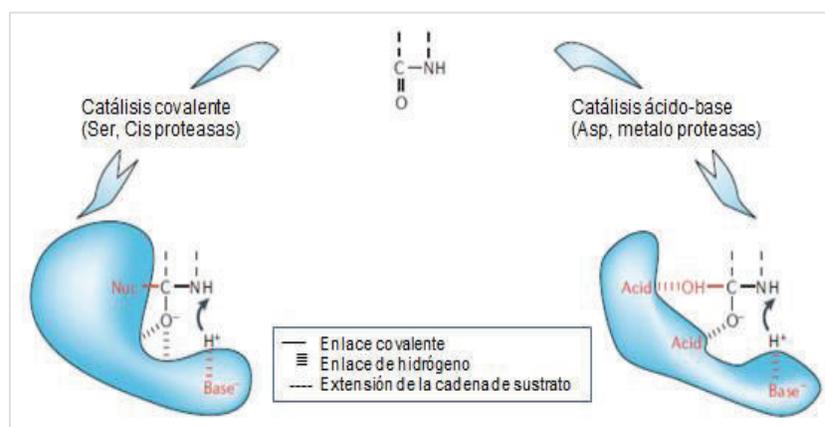


Figura 1.2 Mecanismo catalítico de enzimas proteolíticas
(Turk, 2006, p. 786)

En las serino y cisteíno proteasas, el nucleófilo del sitio catalítico es parte de la cadena lateral de un aminoácido; se da una catálisis covalente, en la que normalmente las histidinas funcionan como una base (Turk, 2006, p. 786).

La triada catalítica del sitio activo de las cisteíno proteasas está formado por cisteína (Cys), histidina (His) y asparagina (Asn). La catálisis ocurre por la presencia de la cisteína que ataca al carbono del grupo carbonilo en la cadena principal peptídica y libera el amino terminal. En el sitio activo de papaína, se cree que sólo Cys e His son catalíticamente activos como un par de iones de tiolato imidazolio (Amri y Mamboya, 2012, p. 101). Además, dentro de la cadena éstos aminoácidos están muy separados, pero por la estructura plegable de la papaína están en estrecha proximidad (Xian, Chen, Liu, Wang y Wang, 2000, p. 20 467).

1.1.4 PAPAÍNA

Las más conocidas cisteíno proteasas son aquellas enzimas que se encuentran en la familia papaína, de las cuales la enzima de origen vegetal es la principal representante (Barret, 2001, p. 5). El término papaína se utiliza tanto para la enzima aislada de forma cristalina, como para la que se encuentra en el látex crudo seco del fruto de la papaya *Carica papaya* (Amri y Mamboya, 2012, p. 99).

La papaína, proteína globular, tiene un peso molecular de 23 406 Da y está formada por 212 residuos de aminoácidos. En su estructura tiene cuatro puentes disulfuro y sus residuos catalíticos se encuentran en las posiciones Gln₁₉, Cys₂₄, His₁₅₈ e His₁₅₉ (Tsuge et al., 1999).

Participa en procesos biológicos vitales en ciertos organismos vivos. También, se caracteriza por ser estable a temperaturas elevadas y altas concentraciones de agentes desnaturalizantes. Tiene actividad a valores de pH entre 5 y 7,5. En estado soluble es poco estable ante la presencia de agentes oxidantes como iones metálicos o el oxígeno de la atmósfera (Edwin y Jagannadham, 2000, p. 70).

Esta enzima tiene actividad proteolítica ante varias proteínas, péptidos de cadena corta, ésteres de aminoácidos y enlaces amida. Preferentemente, hidroliza enlaces con aminoácidos básicos, en particular arginina, lisina y residuos de fenilalanina (Amri y Mamboya, 2012, p. 99).

Su estructura tridimensional tiene dos dominios con una hendidura que los separa. En esta hendidura se localiza el sitio activo, que consta de una triada catalítica, con los aminoácidos cisteína, histidina y aspartato (Tsuge et al., 1999).

En su estado nativo, la papaína tiene baja actividad por lo cual precisa de agentes activadores como la cisteína o borohidruro de sodio. Esta actividad se puede determinar a través de la medición de la tasa de digestión de las proteínas o con la velocidad de hidrólisis de sustratos sintéticos de bajo peso molecular, tales como derivados de amidas o ésteres (Arnon, 1970, p. 226).

1.1.4.1 Actividad proteolítica con BApNA como sustrato

En este método se hidroliza el enlace amida del sustrato sintético de bajo peso molecular. La actividad proteolítica se puede determinar mediante la titulación del grupo carboxilo libre o por la concentración de la amina libre. Así, mediante espectrofotometría, a 405 nm, se puede determinar la p-nitroanilina formada durante la hidrólisis del benzoil arginina-p-nitroanilida (BApNA). En este caso, la actividad proteolítica de papaína se define como la cantidad de papaína que se necesita para la obtención de 1 μmol de p-nitroanilina, por minuto. Con la ecuación [1.1] se expresa dicha relación (Battaner, 2000, p. 160).

$$AE = \frac{DO}{\Delta t} \times \frac{1000 \times Vc}{\epsilon_n \times L \times Ve} \quad [1.1]$$

Donde:

AE: actividad proteolítica con BApNA como sustrato, en U/mL

ΔDO : diferencia de la densidad óptica entre la solución que contiene la enzima y la hidrólisis espontánea del sustrato

Δt : tiempo en el que se mide el avance de la reacción

Vc : volumen de la mezcla de reacción, en μL

Ve : volumen de la solución de papaína en la mezcla de reacción, en μL

ϵ_N : coeficiente de extinción de p-nitroanilina ($8\ 800\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$)

L : longitud del paso de luz (1 cm)

1.1.4.2 Actividad esterásica con p-NPA como sustrato

Con este método, la actividad esterásica se basa en la medición de la velocidad de reacción de hidrólisis del acetato de p-nitrofenilo (p-NPA), a través de la cuantificación de la concentración p-nitrofenol formado, mediante la absorbancia a

348 nm (Fukuda et al., 1996, p. 9). La actividad esterásica, se define como la cantidad de papaína que cataliza la obtención de 1 μmol de p-nitrofenol por minuto, con p-NPA como sustrato y se calcula con la ecuación [1.1] descrita en el acápite 1.1.4.1. En este caso, el valor del coeficiente de extinción del producto formado es $5\ 150\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ (Illanes, Álvarez y Álvaro, 2008, p. 23).

1.2 INHIBIDORES PROTEOLÍTICOS

Un inhibidor es aquella sustancia capaz de reducir la actividad de una enzima. Los inhibidores proteicos o proteolíticos (IP) son proteínas de bajo peso molecular, reguladores endógenos de la actividad de proteasas. Se encuentran distribuidos ampliamente en la naturaleza, especialmente en el reino vegetal, en leguminosas, cereales, papas y algunas frutas (Laskowski, Qasim y Lu, 2003, p. 593).

La actividad inhibidora de los IP se basa en su capacidad de formar complejos estables con proteasas diana de procesos patogénicos, para bloquear, alterar o prevenir el acceso al sitio activo de la enzima. Los inhibidores de cabeza simple pueden inhibir un tipo de enzima proteolítica, pero los de doble cabeza, que cuentan con dos sitios activos independientes, pueden inhibir varios tipos de proteasas a la vez (Laskowski et al., 2003, p. 593). Por esta razón, la genómica y la proteómica ha enfocado su estudio para la detección de dianas terapéuticas que permitan diseñar, desarrollar y obtener nuevos medicamentos con mecanismos de acción capaces de inhibir procesos patogénicos.

Los IP pueden interferir el proceso de digestión de artrópodos fitófagos. Gracias a esta capacidad, constituyen una de las principales herramientas de defensa de las plantas. Son activos ante proteasas de hongos fitopatógenos y algunos nemátodos, virus y bacterias (Lawrence y Koundal, 2002, p. 94).

Además, estas proteínas son relevantes en el campo biomédico pues tienen propiedades terapéuticas que permiten el tratamiento de enfermedades como cáncer, infecciones parasitarias o por hongos; infecciones virales, como

esquistosomiasis, malaria, hepatitis o herpes; enfermedades inflamatorias, inmunológicas, respiratorias o cardiovasculares (Laskowski et al., 2003, p. 593; Leung et al., 2000, p. 305).

Actualmente, varias investigaciones se dirigen hacia combatir la malaria; enfermedad que ha causado cerca de un millón de muertes a nivel mundial. Se ha demostrado experimentalmente que se puede combatir el crecimiento del parásito transmisor de la malaria con el uso de inhibidores de proteasas (García-Fernández et al., 2009, p. 77).

El uso de estas herramientas biológicas debe ser selectiva en cuanto a la unión a su proteasa particular. Se han desarrollado varios métodos y técnicas para detectar, extraer y purificar inhibidores proteolíticos a partir de semillas. Entre estas técnicas se tiene la de cromatografía, placas de ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas y electroforesis (Dos Santos, De Oliveira, Araújo, Ferreira y Araújo, 2012, p. 222).

Un gran número de inhibidores proteolíticos han sido aislados, caracterizados y agrupados en distintas familias de proteínas. La mayor parte de IP caracterizados han sido dirigidos a serino proteasas, sin embargo, el estudio de inhibidores de cisteína proteasas es creciente. Por lo contrario, se han identificado pocos inhibidores para metalo proteasas y para enzimas de tipo aspártico (Laskowski, Qasim y Lu, 2003, p. 593).

Los inhibidores proteolíticos se pueden clasificar en:

- **Inhibidores Kunitz**

Las proteínas de esta familia (18 - 22 kDa) cuentan con dos puentes azufre-azufre y tienen un solo centro activo. Son generalmente activas contra las serino proteasas, sin embargo, también presentan inhibición frente a otras peptidasas, como las de tipo aspártico y cisteína. Los inhibidores Kunitz se encuentran en especies de la familia de las fabáceas, en ciertas gramíneas y en solanáceas,

especialmente en *Solanum tuberosum* y *Solanum lycopersicum*. Se caracterizan por formar un complejo con la proteasa diana, que se disocia de manera lenta (Jamal, Pandey, Singh y Khan, 2013, p. 10).

- **Inhibidores Bowman Birk**

Las proteínas de Bowman Birk también son inhibidores de serino proteasas; tienen un peso molecular menor a 20 kDa. Poseen la capacidad de inhibir una o más proteasas, entre ellas tripsina y quimotripsina. Los inhibidores provenientes de dicotiledóneas forman parte del grupo de doble cabeza, tienen dos dominios homólogos cada uno y un sitio reactivo por separado para las correspondientes proteasas. Por lo general, el primer sitio activo de estos inhibidores es específico para la tripsina, quimotripsina y elastasa. Los inhibidores de plantas monocotiledóneas son de dos tipos. En el primero se encuentran aquellos con cadenas polipeptídicas simples y un sitio reactivo, mientras que, los del segundo grupo tienen dos sitios reactivos (Jamal et al., 2013, p. 11; Raj et al., 2002, p. 928).

- **Inhibidores de papa o patata**

Los inhibidores de esta familia son proteínas presentes en tubérculos de papa y en frutos y hojas del tomate. Se clasifican en dos grupos, los inhibidores de tipo I que son proteínas de bajo peso molecular (menor a 8 kDa), monoméricos que carecen de puentes disulfuro; en el siguiente grupo se encuentran los de tipo II que se componen de múltiples unidades de repetición que varían entre uno y ocho. Los inhibidores de papa tipo I presentan especificidad hacia la quimotripsina y elastasa; mientras que los de tipo II inhiben quimotripsina, tripsina, elastasa y subtilisina (Jamal et al., 2013, pp. 16-17).

- **Inhibidores de cisteíno proteasas**

Las cistatinas o inhibidores de cisteíno proteasas pueden ser extraídas de plantas, microorganismos e incluso invertebrados y vertebrados. Dentro de esta familia hay 4 grupos o subfamilias. En el primer grupo se encuentran las estefinas que

tienen un peso molecular cercano a 11 kDa y su estructura secundaria carece de puentes disulfuro. En el segundo están las cistatinas, cuyo peso molecular está entre 11 y 13 kDa, poseen dos puentes disulfuro. En la subfamilia III están los quinínogenos que tienen un tamaño entre 60 y 120 kDa porque están conformados por tres o más copias de cistatinas (Oliveira, Filho y Sales, 2003, p. 92). En la subfamilia IV se hallan las fitocistatinas, que son proteínas que tienen un tamaño molecular entre 5 y 87 kDa y un solo dominio inhibidor. No tienen puentes disulfuro al igual que las cistatinas, pero se diferencian por ser de origen vegetal. Son activos frente a catepsina, papaína, ficina y bromelina. Presentan inhibición no competitiva (Wu y Haard, 2000).

Las cistatinas y las estefinas son los principales inhibidores de papaína. Su estructura consiste en una hélice alargada y en uno de sus extremos tiene un borde hidrofóbico. Este borde se une o se complementa en la hendidura del sitio activo de la papaína para inhibir su catálisis (Bode y Huber, 1991, p. 445) Estos inhibidores afectan la asimilación de aminoácidos esenciales en insectos del orden coleoptera, durante su digestión, por ello, estos IP se utilizan como controladores biológicos (Botella et al., 1996, p. 1 202).

1.3 PURIFICACIÓN DE INHIBIDORES PROTEOLÍTICOS

La purificación de los inhibidores proteolíticos se puede realizar con la combinación sucesiva de diferentes métodos, con los cuales se eliminan las proteínas no deseadas.

1.3.1 ULTRAFILTRACIÓN POR EXCLUSIÓN DE TAMAÑO

La ultrafiltración es una técnica que permite fraccionar, separar y concentrar proteínas. Se fundamenta en la separación de moléculas, a través de la presión o fuerza centrífuga aplicada a una disolución, en membranas semipermeables de tamaño de poro definido (Kubota, Hashimoto y Mori, 2008, p. 104). La separación

de los componentes presentes en la disolución se realiza con base en su tamaño, en combinación con la fuerza de gravedad aplicada. El sistema dejará que el disolvente y los solutos de menor peso molecular, atraviesen la membrana, mientras que las proteínas de mayor peso molecular sean retenidas en el filtro (Baynes y Dominiczak, 2014, p. 16; Villegas, Acereto y Vargas, 2006, p. 54).

1.3.2 TRATAMIENTO CALÓRICO

Los inhibidores proteolíticos son estables a temperaturas comprendidas entre 60 y 80 °C. Por lo tanto, mediante tratamiento calórico es posible eliminar proteínas inespecíficas de baja estabilidad a temperaturas por debajo de los 60 °C como vía para purificar IP (Brenes y Brenes, 1993, p. 10; Voet y Voet, 2006, p. 137). El tratamiento calórico puede eventualmente desnaturalizar las proteínas según el pH del medio, el tiempo de aplicación, el tamaño de las moléculas y la temperatura (Brenes y Brenes, 1993, p. 11). Se recomienda un tiempo máximo de 30 min para purificar IP provenientes de semillas a 60 °C (Elizalde, Porrilla y Chaparro, 2009, p. 49).

1.3.3 PRECIPITACIÓN SALINA

La precipitación con sales es una técnica que permite fraccionar proteínas en estado natural. Comúnmente se utiliza sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ que se caracteriza por ser una sal altamente soluble. En un extracto crudo existen inhibidores proteolíticos en solución acuosa a una baja salinidad, con la adición de sulfato de amonio se obtienen soluciones con una alta fuerza iónica y se puede eliminar proteínas de fácil agregación (EnCor, 2016). Esta particularidad permite, por una parte, disminuir la interacción de las proteínas con el agua y por otra, purificar proteínas solubles de bajos pesos moleculares tras precipitar a aquellas que no sean de interés (Duong-Ly y Gabelli, 2014, p. 87). Las proteínas precipitan según la cantidad de sal añadida; por tanto, el ajuste de este parámetro determina la proteína que se desea purificar y aquellas que se desean eliminar.

Después del proceso de precipitación salina las proteínas quedan con altas concentraciones de sal, por esta razón, es necesario remover o eliminar la sal de las muestras. Existen diferentes métodos para remover el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de una muestra, por ejemplo, diálisis o cromatografía de exclusión de tamaño (Duong-Ly y Gabelli, 2014, p. 87).

1.3.4 CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

En general, un sistema de cromatografía consta de un soporte o matriz porosa y la fase móvil que atraviesa la matriz. La solución de proteína a fraccionar se alimenta a través de una bomba al sistema; luego, se ubica en capas sobre el lado superior de la columna y se deja que fluya por la fase estacionaria. Las fracciones eluidas son recolectadas según como migren por la matriz (Nelson y Cox, 2009, p. 91). En la Figura 1.3 se encuentra una representación gráfica del fraccionamiento de proteínas por cromatografía.

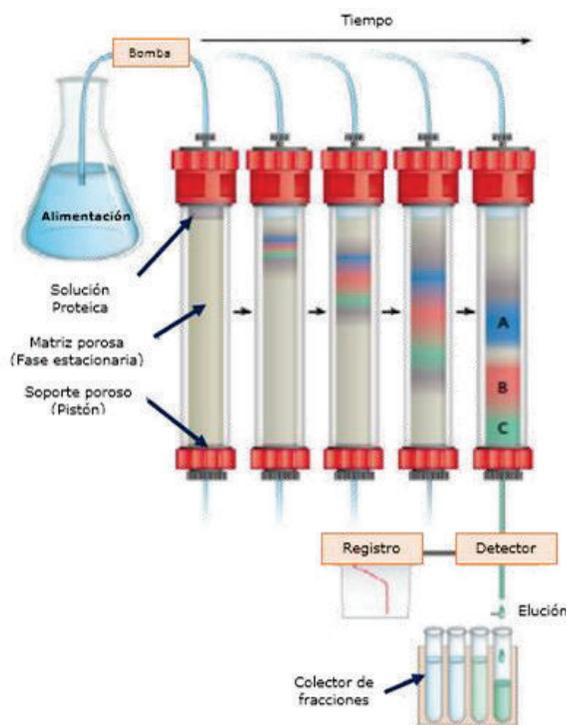


Figura 1.3 Sistema de cromatografía y principales elementos (Nelson y Cox, 2009, p. 91)

Se puede mejorar el grado de purificación de inhibidores proteolíticos, gracias a la capacidad de unión específica a las enzimas que inhiben, mediante cromatografía de afinidad (CA). A diferencia de otros métodos cromatográficos, con esta técnica se aprovechan las propiedades bioquímicas inherentes de las proteínas y no las propiedades fisicoquímicas (Oliveira et al., 2007)

Para lograr una mejor purificación de IP esta técnica se aplica como último paso después de métodos de baja resolución, como los mencionados anteriormente. También, esta técnica cromatográfica permite la separación de biomoléculas según su función biológica (Cuatrecasas, 1970, p. 3 059; Turková, 1993, p. 8).

En la CA una solución proteica impura (fase móvil) atraviesa la columna que contiene un polímero insoluble (Cuatrecasas, 1970, p. 3 059); las proteínas de interés se unen de manera no covalente a la superficie del ligando inmovilizado (fase estacionaria) y las otras proteínas son eluidas de la columna con una solución tampón. Para recuperar las proteínas deseadas se realiza una segunda elución a diferentes condiciones (Voet y Voet, 2006, p. 105).

La matriz o columna de cromatografía es el soporte que contiene el ligando adherido covalentemente. Debe presentar resistencia mecánica y química, porosidad con buena capacidad de enlazamiento, estabilidad a cambios de pH y presencia de agentes detergentes. El ligando se caracteriza por ser altamente específico y selectivo para las moléculas que se desean purificar (Coelho, Santos, Napoleao, Correia y Paiva, 2012, p. 56).

1.3.4.1 Inmovilización covalente de enzimas

La etapa inicial para purificar inhibidores proteolíticos por cromatografía de afinidad es la inmovilización de su correspondiente enzima en una matriz o en un gel de acoplamiento (Coelho et al., 2012, p. 56; Turková, 1993, p. 31; Voet y Voet, 2006, p. 105).

El término “enzima inmovilizada” hace referencia a enzimas localizadas o confinadas de forma física en una región del espacio y que retienen su actividad catalítica para poder emplearse repetida y continuamente. Las enzimas pueden ser enlazadas al soporte por diferentes métodos, entre los más utilizados, atrapamiento físico, intercambio iónico y enlace covalente. Los polímeros empleados para este fin son la agarosa (Sepharosa) y el dextrano reticulado (Sephadex) (Dos Santos, De Oliveira, Araújo, Ferreira y Araújo, 2012, p. 223).

El método de atrapamiento físico consiste en la oclusión de la enzima en la matriz polimérica. En este tipo de inmovilización el sustrato y el producto atraviesan la fase estacionaria, mientras que, la enzima queda retenida. El atrapamiento puede ser en gel, fibra o mediante micro-encapsulación (Brena y Batista, 2006, p. 21).

La inmovilización por intercambio iónico se fundamenta en las interacciones de la proteína con el ligando, según su carga eléctrica. En este método la fase estacionaria se conoce como intercambiador iónico pues su superficie contiene cargas electrostáticas fijas para retener los contraiones de la fase móvil (Voet y Voet, 2006, p. 106).

Los métodos de inmovilización o enlazamiento covalente se basan en la formación de un enlace covalente entre la enzima y la matriz. Esta unión covalente se da a través de enlaces amida, éter, tioéter o carbamato con los residuos de aminoácidos de lisina, cisteína, tirosina e histidina (Brena y Batista, 2006, p. 16). Los métodos de acoplamiento pueden ser a través de la activación de la matriz, con la adición de un reductor que genere grupos electrofílicos que pueden reaccionar con los grupos nucleófilos de la enzima. Con esta inmovilización y bajo las condiciones necesarias, se obtiene un producto estable con una pérdida mínima de enzima (Pérez, 1996, p. 108; Tripathi, 2009, p. 38).

La mayor parte de reacciones que permiten la inmovilización covalente de enzimas son de tipo carbonilo, en el que los nucleófilos de las proteínas son los grupos $-NH_2$, $-SH$ y $-OH$. El anión sulfuro tiene mayor reactividad nucleofílica que aquellos compuestos de nitrógeno y oxígeno. Sin embargo, los tioésteres que

forma tienen menor estabilidad que los ésteres, y éstos a su vez son menos estables que las aminas formadas en la reacción con grupos aminos. Bajo este análisis, los residuos que intervienen en la inmovilización son: L-ácido aspártico, L-serina, L-glutámico, L-treonina, L-arginina, L-lisina, L-tirosina, L-histidina, L-triptófano, L-metionina y L-cisteína (Bonzón, 1996, p. 14).

Con el objetivo de mejorar la actividad funcional del producto inmovilizado covalentemente, se han desarrollado estrategias, como, por ejemplo: inmovilizar la enzima en presencia del sustrato o de un inhibidor o modificar químicamente la enzima con los residuos que intervienen en la unión covalente. Además, en la inmovilización covalente de enzimas se deben analizar tres factores principales: 1) los grupos funcionales de la enzima; 2) la reacción química que dará paso a la unión covalente entre la proteína y el soporte y 3) la modificación o activación del soporte (Bonzón, 1996, p. 14).

Entre las reacciones de unión covalente de las enzimas se tiene la formación de bases de Schiff, las cuales se forman entre los grupos carboxilos de la matriz activada con los grupos aminos libres. Específicamente, del nitrógeno del residuo de L-lisina, sobre el carbono de la matriz. Para esto, el soporte debe ser oxidado con peryodato o dimetil-sulfóxidos hasta obtener grupos glioxilo (Galván y Muñoz, 2006, p. 6).

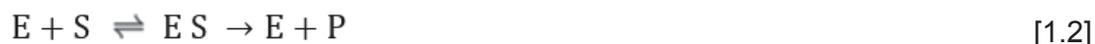
La principal desventaja de este tipo de inmovilización es que, durante el proceso de unión covalente, la enzima pierde actividad funcional como resultado de la interacción del centro activo con los grupos funcionales del soporte o por la modificación de la estructura tridimensional. Este último factor afecta la disposición espacial del centro catalítico y dificulta la unión con el sustrato (Tripathi, 2009, p. 38; Mikkelsen, 2011, p. 89).

Otros factores que pueden disminuir la actividad enzimática durante la inmovilización son las condiciones del pH de incubación y el proceso de reducción con borohidruro de sodio (Mateo et al., 2005, p. 276).

1.4 CARACTERIZACIÓN DE INHIBIDORES DE PROTEASAS

1.4.1 CARACTERIZACIÓN CINÉTICA

La reacción catalítica de una enzima se describe de manera general mediante la ecuación [1.2], especificada por Michaelis-Menten.



La ecuación [1.2] indica que en la catálisis de una enzima libre (E) se forma inicialmente un complejo enzima-sustrato (ES). Después, este complejo se transforma en el producto (P) de la reacción y la enzima libre. La formación del producto permite determinar la velocidad de reacción global por ser la etapa lenta (Voet y Voet, 2006, p. 493).

La velocidad de una catálisis enzimática, que implique el aumento de P o la disminución de S, es una función no lineal de S. Mientras la cantidad de sustrato aumenta, la velocidad de catálisis tiende a un límite, que se conoce como velocidad máxima. En la Figura 1.4 se observa esta relación de dependencia hiperbólica.

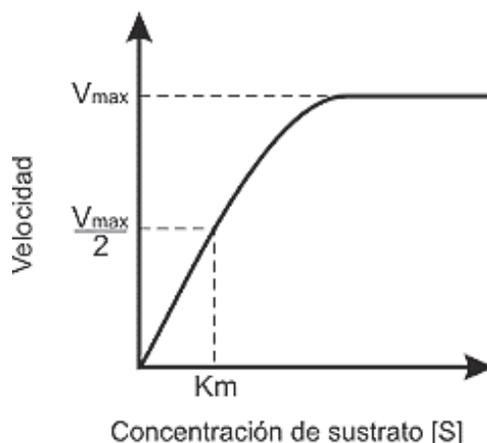


Figura 1.4 Cinética Enzimática. Modelo de Michaelis-Menten (Voet y Voet, 2006, p. 493).

En el modelo de Michaelis-Menten intervienen dos parámetros cinéticos importantes: la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$), que corresponde a la velocidad máxima de reacción que ya no depende de la cantidad de sustrato y la constante de Michaelis-Menten (K_m), que indica la concentración de S en la que la velocidad de reacción es la mitad de $V_{m\acute{a}x}$. Además, K_m indica la afinidad de la enzima por el sustrato; así, el valor de K_m aumenta cuando la afinidad disminuye.

En la Figura 1.4, se observa que la cinética enzimática propuesta por Michaelis-Menten presenta tres etapas. Cuando la concentración del sustrato es baja, la velocidad de reacción tiene una relación lineal con dicha concentración y se da una cinética de primer orden; en concentraciones medias de sustrato, la velocidad no es lineal y se forma una cinética mixta; para concentraciones altas de sustrato, la cinética es de orden cero y la velocidad de reacción es constante e independiente de la concentración de sustrato (Nelson y Cox, 2009, p. 207).

Además, en el modelo de Michaelis-Menten se consideran dos aspectos. Primero, la aproximación a un estado estacionario en el cual la concentración del complejo ES es pequeña y permanece constante durante la reacción enzimática; y segundo, que la conversión de reactivos a productos se da mediante una reacción de primer orden.

Para el modelo de Michaelis-Menten, se tiene la ecuación [1.3].

$$V_o = \frac{V_{m\acute{a}x} \times [S]}{[S] + K_m} \quad [1.3]$$

Donde:

V_o : Velocidad de reacción enzimática, en U/mL

$V_{m\acute{a}x}$: Velocidad máxima de reacción

[S]: Concentración de sustrato, en mM

K_m : Constante de Michaelis-Menten, en mM

Hans Lineweaver y Dean Burk linealizaron la ecuación del modelo matemático de Michaelis-Menten para determinar algebraicamente los valores de la constante K_m y la velocidad máxima $V_{m\acute{a}x}$. Estos parámetros cinéticos se obtienen del gráfico del inverso de la velocidad de reacción ($1/V$) versus el inverso de la concentración de sustrato ($1/[S]$) (Nelson y Cox, 2009, p. 204).

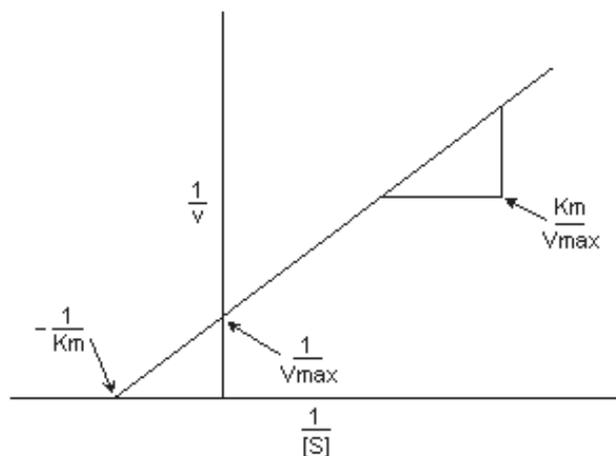


Figura 1.5 Gráfico de los dobles recíprocos de Lineweaver y Burk
(Nelson y Cox, 2009, p. 204)

Las enzimas que obedecen la relación cinética de Michaelis-Menten la gráfica de los dobles recíprocos, de la Figura 1.5, forma una línea recta. El valor de la pendiente indica la relación entre la constante K_m y la velocidad máxima; mientras que, la intersección con el eje de las ordenadas corresponde al inverso de la velocidad máxima y la intersección con el eje de las abscisas es el inverso negativo de la constante K_m . La linealización de Lineweaver-Burk es útil en el análisis de mecanismos de reacción enzimática y de inhibición enzimática.

1.4.1.1 Mecanismos de inhibición

Existen dos mecanismos de inhibición: el irreversible y el reversible. El primer mecanismo implica una unión covalente que es permanente; mientras que, la inhibición reversible ocurre mediante enlace no covalente con el inhibidor, por lo tanto, la unión puede revertirse. Se han identificado diferentes tipos de inhibición

reversible, entre ellos está la competitiva, no competitiva y mixta (Nelson y Cox, 2009, p. 210).

En la inhibición competitiva existe una unión excluyente, pues el inhibidor compite con el sustrato por el centro activo de la enzima. Los inhibidores competitivos tienen estructura similar a la del sustrato y como consecuencia de ello se unen al centro activo e impiden la afinidad de la enzima con el sustrato (Peretó et al., 2007, p. 109). La $V_{m\acute{a}x}$ de reacción permanece constante; sin embargo, requiere de mayor cantidad de sustrato para alcanzarla, por lo tanto, ocurre un incremento en el valor de K_m que indica la pérdida de afinidad de la enzima por el sustrato (Müller, 2004, p. 178).

En la inhibición no competitiva, el inhibidor no se une a la enzima libre pues se enlaza una vez que se ha formado el complejo enzima-sustrato. Este mecanismo es poco común en enzimas con sustratos únicos (Peretó et al., 2007, p. 110). La $V_{m\acute{a}x}$ y la K_m se ven afectadas ante la presencia del inhibidor y varían en la misma proporción (Müller, 2004, p. 179).

La inhibición mixta también ocurre en enzimas con más de un sustrato. En este caso, el inhibidor se une al sitio activo y deja libre la unión para el primer sustrato, pero no para un segundo sustrato. De esta manera el inhibidor actúa como inhibidor no competitivo con el primer sustrato y como inhibidor competitivo con el segundo. Al no unirse el inhibidor al centro activo, no hay pérdida de afinidad hacia el sustrato, por tanto, la K_m no cambia, pero la $V_{m\acute{a}x}$ sí disminuye con el inhibidor (Müller, 2004, p. 178).

En la Figura 1.6 se presentan las gráficas del método de dobles recíprocos propuesto por Lineweaver y Burk de los diferentes tipos de inhibición.

Según el mecanismo de inhibición los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ sufren variaciones que se modifican por un factor α o α' . En la Tabla 1.1 se presentan los cambios de los parámetros cinéticos según el tipo de inhibición.

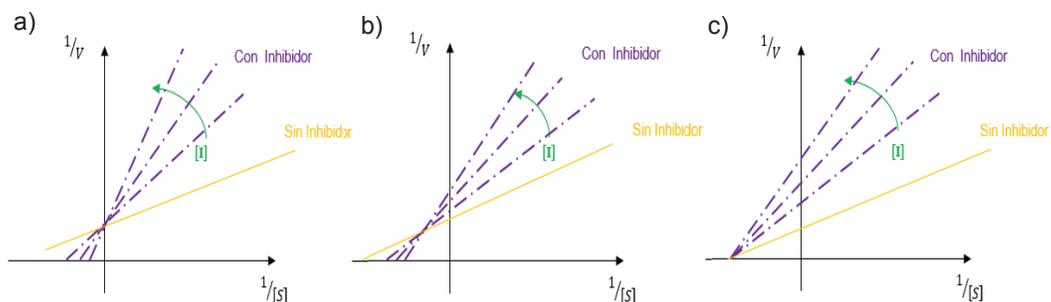


Figura 1.6 Gráficos de los dobles recíprocos de inhibición a) competitiva, b) mixta y c) no competitiva.

Tabla 1.1 Variación de los parámetros cinéticos por el mecanismo de inhibición

Mecanismo de Inhibición	Km aparente	Vmáx aparente
Sin inhibidor	Km	Vmáx
Competitiva	α Km	Vmáx
No competitiva	Km/α'	$Vmáx/\alpha$
Mixta	α Km/ α'	$Vmáx/\alpha'$

(Nelson y Cox, 2009, p. 210)

El grado de afinidad del inhibidor hacia la enzima está representado por la constante de inhibición y se calcula con la relación de α o α' y la concentración del inhibidor, como indica la ecuación [1.4].

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i} \quad [1.4]$$

Donde:

- α : Factor alfa
- [I]: Concentración de inhibidor, en mM
- K_i : Constante de inhibición, en mM

1.4.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

1.4.2.1 Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis consiste en la migración de solutos iónicos, hacia un cátodo o ánodo, a través de la influencia de un campo eléctrico. Este método es altamente sensible, de buena resolución y versatilidad. Entre sus aplicaciones están la separación de mezclas de ADN y ARN, de proteínas y otras moléculas biológicas; la determinación del peso molecular, punto isoeléctrico y para cuantificar las cadenas de péptidos presentes en proteínas.

La electroforesis con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) permite determinar el peso molecular y punto isoeléctrico (2SDS-PAGE) de las moléculas tras aplicar cargas eléctricas. Según la carga y masa, las moléculas se movilizan en un campo eléctrico a una determinada velocidad (Lodish et al., 2005, p. 87). La técnica SDS-Page es la electroforesis más empleada para determinar el peso molecular de proteínas debido a que la mayoría de proteínas son solubles en SDS, es de rápida migración y el complejo SDS-proteína es de fácil tinción, lo cual permite una mejor visualización de las bandas formadas (Gallo y Morales, 2006, p. 21).

El SDS es un detergente que, además de desnaturalizar completamente la molécula, carga negativamente a las proteínas para facilitar la movilización hacia el ánodo (+) y así separarlas por su tamaño molecular (Arias, 2012, p. 382).

Normalmente se utiliza gel de poliacrilamida debido a que es inerte, tiene buena estabilidad mecánica y es de preparación rápida y reproducible. Para la formación de dicho gel, se polimeriza una solución de monómeros de acrilamida y bisacrilamida, con catalizadores como el TEMED e iniciadores como el persulfato de amonio (Lodish et al., 2005, p. 87).

El tamaño de poro del gel formado está definido por la concentración de los monómeros, por ello el ajuste de estos parámetros es importante para una

correcta corrida electroforética. Para pesos moleculares sobre los 150 kDa, se recomienda una concentración de acrilamida de 5 % y para pesos moleculares menores a 10 kDa se debe tener concentración del monómero superior al 15 % (Schagger y Von Jagow, 1987, p. 369)

Las muestras para electroforesis deben ser preparadas con agentes desnaturalizantes para reducir los puentes disulfuros a grupos tioles. Esta reducción, que se puede realizar con 2-mercaptoetanol, se realiza para disociar las moléculas. Además, la muestra debe ser teñida con colorante orgánico como el azul de bromofenol para visualizar las bandas formadas al final de la corrida (Lomonte, 2002, p. 95).

La mezcla de proteínas previamente preparada, se hace a travesar por el gel polimerizado, se aplica una carga eléctrica y las proteínas más grandes migran lentamente, respecto a las de menor tamaño, a través de la matriz (Arias, 2012, p. 382; Lodish et al., 2005, p. 87).

Al finalizar la corrida electroforética los geles deben ser teñidos con azul de Coomassie o nitrato de plata y decolorados con ácido acético y etanol para visualizar las bandas formadas (Lomonte, 2002, p. 95).

Para estimar el peso molecular de las muestras se utiliza la movilidad electroforética relativa (Rf) que indica el desplazamiento de las proteínas, respecto al frente de migración. Este cálculo se realiza con la ecuación [1.5] (Gallo y Morales, 2006, p. 25).

$$Rf = \frac{\text{Distancia que migra la muestra}}{\text{Distancia que migra el marcador}} \quad [1.5]$$

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 MATERIALES Y EQUIPOS

2.1.1 MATERIALES

- Celdas de cuarzo para espectrofotómetro
- Columna de cromatografía (vidrio; L = 50 cm)
- Embudo con frita
- Micropipetas de 100 – 1 000 μ L
- Tubos Millipore Amicon Ultra para ultrafiltración (10 y 50 kDa)

2.1.2 EQUIPOS

- Balanza analítica, ACCULAB, 110 g, 0,0001 g
- Bomba de vacío, DENTSPLY, modelo C2428
- Bomba peristáltica, GILSON, modelo Miniplus 2
- Centrífuga, WIFUG, modelo 2000 E, 5 800 rpm
- Equipo de electroforesis, Thermo Electron Corporation, EC 250-90
- Espectrofotómetro UV-Visible, Hitachi, modelo U-1 900
- pHmetro, JENWAY, modelo 3 510
- Rotavapor, IKA, modelo RV10B599
- Sistema de cromatografía, Pharmacia, modelo LKB-FRAC 100

2.1.3 REACTIVOS

- Acetato de para-nitrofenilo (p-NPA), grado analítico, SIGMA
- Acetato de sodio anhidro, grado analítico, Mallinckrodt Chemical
- Ácido acético, 99 % de pureza, Riedel-de Haën AG
- Ácido bórico, grado analítico, Riedel-de Haën AG

- Ácido etilendiaminotetraacético, grado analítico, Loba Chemie
- Acrilamida, grado electroforesis, Bio-Rad
- Azul brillante de tetrabromofenol, grado electroforesis, SIGMA
- Bisacrilamida, grado electroforesis, Bio-Rad
- Borohidruro de sodio, pureza 98 %, SIGMA
- Coomassie Brilliant blue, grado electroforesis, MERCK
- Dimetil formamida, 99 % de pureza, Mallinckrodt
- Dodecil sulfato de sodio, grado electroforesis, SIGMA
- Hidróxido de sodio, grado analítico, BDH Laboratory
- Papaína, 3,18 U/mg, FLUKA
- Persulfato de amonio, 99 % de pureza, Promega
- Peryodato de sodio, grado analítico, BDH Laboratory
- Sepharosa 6B-CL, SIGMA
- Sulfato de amonio, 99 % de pureza, Riedel de Haën Seelze
- Tris HCl, grado electroforesis, SIGMA
- Yoduro de potasio, 99 % de pureza, Panreac
- L-cisteína, 97 % de pureza, SIGMA
- N- α Benzoil L-arginina p-nitroanilida (BApNA), grado analítico, SIGMA
- 1-Propanol, pureza 99 %, BDH Laboratory
- 2-Mercaptoetanol, grado electroforesis, MERCK

2.2 SELECCIÓN DEL VALOR DE pH DE INMOVILIZACIÓN DE PAPAÍNA

2.2.1 ACTIVACIÓN Y OXIDACIÓN DE LA MATRIZ DE AFINIDAD

Inicialmente se acondicionó el soporte de inmovilización, para esto se solubilizó NaBH₄ en NaOH 1,7 M y se adicionó gel de sepharosa y glicidol; se mezcló mediante agitación magnética en baño de hielo. Luego de 16 h de agitación, la gliceril-sepharosa obtenida se filtró en frita y la fracción retenida se lavó con agua destilada (Betancourt, 2011, p. 44). A continuación, la matriz se oxidó con

periyodato de sodio 0,12 M, mediante agitación constante, durante 1 h. Después de la oxidación la glioxil-sepharosa se filtró en embudo con fritas y se lavó con agua destilada (Bonzón, 1996, p. 35). En la Figura A1.1 del Anexo I se muestra el esquema del proceso de activación y oxidación de la matriz de sepharosa.

2.2.2 INMOVILIZACIÓN DE PAPAÍNA EN EL SOPORTE DE GLIOXIL-SEPHAROSA 6B-CL

En la matriz preparada se inmovilizó covalentemente papaína (PA) según el método propuesto por Bonzón (1996, p. 36). Para la incubación se preparó una solución enzimática de 12 mg de enzima/mL de glioxil sepharosa en tampón borato 0,1 M y se mezcló con 15 g de la matriz, durante 2 h. En el sobrenadante de la mezcla de incubación, se determinó la concentración de proteína, cada 15 min, espectrofotométricamente con la medición de la absorbancia a 280 nm (Aitken y Learmonth, 2002, p. 3), para determinar la cantidad de enzima que se adhirió al soporte.

La papaína inmovilizada se redujo con 5 mg de NaBH_4 /mL de gel por 60 min en baño de hielo (Quinchuela, 2013, pp. 32-35). La matriz inmovilizada se filtró y lavó tres veces con el uso combinado de 15 mL de tampón acetato 0,1 M pH 4 y 15 mL de tampón tris HCl 0,1 M pH 8. Se lavó la matriz tres veces con 15 mL del tampón de inmovilización. El filtrado y los lavados se recolectaron por separado. Se determinó la concentración de proteína a 280 nm, al igual que la actividad enzimática con BApNA como sustrato, en cada una de las fracciones (Bonzón, 1996, p. 36).

2.2.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

El efecto del pH en la inmovilización se estudió con un diseño experimental completamente al azar, en el cual se evaluaron 4 niveles de pH (8, 9, 10 y 11) con dos repeticiones en cada uno. Los datos se procesaron mediante un análisis

de varianza en el software Statgraphics Centurion XV (95 % de confianza). Se determinaron el porcentaje de enzima inmovilizada (% EI), el porcentaje de actividad enzimática inmovilizada (% AEI), el porcentaje de retención de actividad funcional (% RAF) y la actividad enzimática específica (AEE). En el Anexo II se detallan los procedimientos para el cálculo de estas variables.

2.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL PROCESO DE REDUCCIÓN CON NaBH₄ DEL PRODUCTO INMOVILIZADO

2.3.1 INMOVILIZACIÓN DE PAPAÍNA EN GLIOXIL-SEPHAROSA PARA DEFINIR EL MEJOR PROCESO DE REDUCCIÓN

Luego de la activación y oxidación del soporte, se inmovilizó papaína al pH que presentó mayor % RAF. El proceso de inmovilización se realizó durante 2 h, en baño de hielo; una vez concluido este tiempo, se pesó NaBH₄, en función de las concentraciones a evaluar, que fueron 5 y 10 mg/mL_{gel} y se agregaron directamente o disuelto en el tampón de inmovilización, a la mezcla anterior. Para los tratamientos con los que se evaluó la adición en solución refrigerada, se pesó NaBH₄ y se colocó en matraces de 10 mL. Luego, se aforaron con tampón borato al pH de inmovilización. Para el proceso de reducción se dejó en agitación magnética durante 1 h. Tiempo después, se realizaron los procesos de lavado con soluciones amortiguadoras acetato 0,1 M pH 4, tris HCl 0,1 M pH 8 y borato 0,1 M al pH de inmovilización, como se especificó en el acápite 2.2.2.

2.3.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para evaluar la influencia del proceso de reducción con NaBH₄ del producto inmovilizado, se aplicó un diseño completamente al azar con el que se evaluaron tratamientos (por duplicado) que combinaron la concentración de NaBH₄, en niveles de 5 y 10 mg/mL_{gel}, y la forma de adición del reductor, ya sea agregado directamente o disuelto en el mismo tampón de inmovilización.

En la Tabla 2.1 se muestran los tratamientos que se realizaron en este diseño experimental. La variable de respuesta fue el % RAF y la selección del mejor proceso de reducción se realizó con base en el mayor valor de esta variable de salida. El análisis de los datos experimentales se realizó a través del software Statgraphics Centurion XVI, con un nivel de confianza del 95 %.

Tabla 2.1 Tratamientos empleados para evaluar el proceso de reducción de papaína-glioxil-sepharosa con NaBH₄

Código de Tratamiento	Concentración de NaBH ₄ (mg/mL gel)	Forma de adición
T1	10,00	Directa
T2	10,00	En solución refrigerada
T3	5,00	Directa
T4	5,00	En solución refrigerada

2.4 PURIFICACIÓN DE LAS FRACCIONES INHIBIDORAS MÁS ACTIVAS DE PAPAÍNA

2.4.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ACUOSOS DE LAS SEMILLAS

Esta investigación se realizó con semillas certificadas de amaranto (*Amaranthus caudatus* L., var. I-Alegría), arveja (*Pisium sativum*, var. I.-432-Lojanita), chocho (*Lupinus mutabilis*, var. I-450-Andino), fréjol (*Phaseolus vulgaris*, var. I-481-Rojo del valle), quinoa (*Chenopodium quinoa*, var. I-Tunkanhuan) y sangorache (*Amaranthus hybridus* L.) donadas por la estación Santa Catalina, perteneciente al instituto de investigaciones INIAP.

Inicialmente la harina de las semillas mencionadas fue desengrasada, según el método desarrollado por Muñoz (2011, pp. 28-29). Este proceso se realizó a través de una extracción sólido-líquido con alcohol propílico, en una relación 1:4 sólido-líquido. El esquema de la fase de desengrasado de las harinas se muestra en la Figura A1.2 del Anexo I.

Cada harina desengrasada se suspendió y agitó por separado, durante 1,5 h a 400 rpm, con tampón fosfato 50 mM pH 6, en una relación 1:5 (m:v). A continuación, la solución se centrifugó a $835 \times g$, durante 30 min; el sobrenadante obtenido se colocó en tubos para centrifuga. Se ultrafiltró con una membrana de 50 kDa a $2\ 000 \times g$, durante 40 min. Se recolectaron las fracciones con pesos moleculares bajo los 50 kDa y se denominaron como extractos acuosos (Echeverría, 2014, p. 39, modificado). En la Figura A1.3 se muestra el esquema del proceso de obtención de los extractos acuosos o extractos crudos.

2.4.2 SELECCIÓN DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS CON ACTIVIDAD INHIBIDORA SOBRE PAPAÍNA

2.4.2.1 Determinación de la actividad inhibidora y actividad inhibidora específica de extractos acuosos

La actividad inhibidora (AI) se definió como la diferencia de la actividad proteolítica con inhibidor, respecto a aquella en ausencia del mismo y se expresó en mili unidades enzimáticas por mililitro de extracto acuoso (mU/mL) (Muñoz, 2011, p. 28). Para determinar la actividad proteolítica de papaína se utilizó el método de Earlander et al., (1961), expuesto en el acápite 1.1.4.2 y modificado. Se mezclaron, en una celda de cuarzo, 200 μ L de papaína (7 mg/mL), 2 000 μ L de tampón fosfato 50 mM pH 6 y 200 μ L de p-NPA (8 mg/mL).

La actividad proteolítica de papaína, en presencia de los extractos inhibidores se determinó con la reacción de 200 μ L de papaína (7 mg/mL), 1 400 μ L de tampón, 600 μ L del extracto acuoso con inhibidor y 200 μ L de p-PNA (8 mg/mL). La actividad inhibidora específica (AIE) se calculó como la relación de la actividad inhibidora y la concentración de proteína en cada extracto (El-Yassi, 2012, p. 2). En el Anexo III se presenta el detalle del cálculo de estas variables.

Se aplicó un test de rangos múltiples con el método LSD, con la actividad inhibidora específica de cada extracto como variable. Se analizaron los datos con el software Statgraphics Centurion XV, a un nivel de confianza del 95 %, con tres repeticiones para cada semilla. Se seleccionaron los inhibidores de papaína más activos a aquellos extractos con mayor AIE, para ser purificados selectivamente.

2.4.3 PURIFICACIÓN PARCIAL DE LOS INHIBIDORES MÁS ACTIVOS DE PAPAÍNA

Los extractos acuosos con mayor actividad inhibidora fueron tratados a 60 °C en baño María; luego, fueron ultrafiltrados en una membrana de 10 kDa, durante 45 min, a 2 800 × *g*. Se recolectaron las fracciones permeadas para ser tratadas con (NH₄)₂SO₄ al 60 % de saturación. En cada etapa, se determinó la actividad inhibidora, concentración de proteína y actividad inhibidora específica de las fracciones permeadas.

2.4.4 PURIFICACIÓN DE LOS INHIBIDORES MÁS ACTIVOS PRESENTES EN LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE LAS SEMILLAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD EN UNA MATRIZ DE PAPAÍNA-GLIOXIL-SEPHAROSA 6B-CL

2.4.4.1 Cromatografía de afinidad en papaína-glioxil-sepharosa 6B-CL

Se purificaron selectivamente a los inhibidores más activos de papaína mediante cromatografía de afinidad en 50 g de papaína-glioxil-sepharosa 6B-CL. Se inmovilizó papaína al pH seleccionado según el acápite 2.2.3 y se redujo el soporte bajo las condiciones elegidas en la sección 2.3.2.

La matriz de papaína-glioxil-sepharosa se lavó con tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7,50. Se colocaron 50 mL de la matriz en la columna de cromatografía, hasta alcanzar una altura de 33 cm y después se ubicaron los pistones (Félix,

2008, p. 40). En la columna se lavó nuevamente el soporte con el mismo tampón por 30 min. El tampón se alimentó a la columna con el uso de una bomba peristáltica y se reguló el flujo a 0,5 mL/min.

Después del lavado se añadieron 5 mL de las fracciones semipurificadas con mayor actividad de inhibición frente a papaína, seguido de solución tampón. Se recolectaron fracciones de 3 mL y en cada una se determinó la concentración de proteína, mediante espectrofotometría a 280 nm. Cuando las fracciones recolectadas tuvieron una concentración de proteína de cero, los inhibidores fueron eluidos con una solución de KCl-HCl 1 M. Se determinaron la actividad inhibidora y concentración de proteína en cada fracción eluída (Echeverría, 2014, pp. 45-47).

Finalmente, se realizó el esquema cromatográfico de esta etapa, con la actividad inhibidora y actividad inhibidora específica versus el número de fracción recolectada.

2.4.5 DISEÑO DE UN SISTEMA DE PURIFICACIÓN DE LOS INHIBIDORES MÁS ACTIVOS PRESENTES EN LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE LAS SEMILLAS

En cada etapa de purificación parcial se determinó el grado de purificación (GP), definido como el coeficiente entre los valores de la actividad inhibidora específica lograda después y antes de cada fase de purificación. Para los inhibidores más activos de papaína, se diseñó un sistema de purificación mediante la evaluación de la influencia que ejercen, en el grado de purificación global, las etapas de ultracentrifugación con membranas de 50 y 10 kDa, de tratamiento térmico a 60 °C, de insolubilización selectiva con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y de cromatografía de afinidad.

Se partió del resultado logrado con la aplicación de todas las etapas y se eliminaron a aquellas que menor aporte tuvieron sobre el GP. Se combinaron las mejores etapas de bajo grado de resolución con la de cromatografía de afinidad.

2.5 CARACTERIZACIÓN CINÉTICA Y MOLECULAR DE LAS FRACCIONES INHIBIDORAS MÁS ACTIVAS DE PAPAÍNA

2.5.1 CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LAS FRACCIONES CON LOS INHIBIDORES MÁS ACTIVOS DE PAPAÍNA

Se midió la actividad enzimática de la papaína en presencia y en ausencia de los extractos inhibidores, con p-NPA como sustrato, en diferentes concentraciones, según el apartado 2.4.2.1 (Fukuda et al., 1996, p. 9). Para determinar la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) y la constante de Michaelis-Menten (K_m) se realizó el gráfico de los dobles recíprocos.

En el Anexo V se presenta un ejemplo de cálculo de la caracterización cinética.

Los valores de los parámetros cinéticos fueron evaluados según lo expuesto en el apartado 1.4.1. Con la ecuación [1.4] se determinó la constante de inhibición.

2.5.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS INHIBIDORES MÁS ACTIVOS DE PAPAÍNA

2.5.2.1 Desnaturalización de las muestras

El peso molecular de los inhibidores más activos de papaína obtenidos después de la cromatografía de afinidad se estimó mediante electroforesis SDS-PAGE. Se tomaron 0,20 mL de las fracciones inhibidoras y se mezclaron con 0,20 mL de una solución de desnaturalización (SDS al 4 %; tampón Tris-HCl 50 mM pH 6,80; glicerol al 12 %; 2-mercaptoetanol al 2 % y azul de bromofenol). Las muestras se sometieron a calentamiento a 90 °C por 10 min (Félix, 2008, p. 43).

El estándar utilizado para los extractos crudos tenía un peso molecular en el rango de 10 a 100 kDa. El estándar para los extractos purificados tenía un peso

entre 2,56 y 17,20 kDa. Los estándares fueron desnaturalizados previo a su uso.

2.5.2.2 Preparación de geles

Para la corrida electroforética se formaron geles de 1 mm de espesor a diferentes concentraciones de poliacrilamida para el gel concentrador y el gel separador. La solución de poliacrilamida estaba formada por acrilamida al 48,0 % y bisacrilamida al 1,5 %. Para el gel separador se utilizó una solución formada por 16,0 % de poliacrilamida, 33,0 % de tampón gel; 10,6 % de glicerol y 22,7 % de agua destilada. Además, para iniciar la polimerización se utilizaron 15 μ L de TEMED y 150 μ L de persulfato de amonio (10 %) (Schagger y Von Jagow, 1987, p. 369; Félix, 2008, p. 45).

Se colocó 1 mL de isobutanol para eliminar la curvatura sobre la superficie del gel y se dejó polimerizar durante 30 min (Lomonte, 2002, p. 97). Se retiró el exceso de alcohol y se procedió a preparar el gel concentrador, que estaba formado con 10 % de solución de poliacrilamida, 33 % de tampón de gel, 57 % de agua, TEMED y persulfato de amonio (Schagger y Von Jagow, 1987, p. 369). En cada pocillo se cargaron 20 μ L de muestra y de estándar desnaturalizados. Luego, se colocaron las placas de gel dentro de la cámara y se llenó con tampón de cátodo (Tris 0,03 M pH 8,25; glicina 0,93 M y SDS 0,10 %) y de ánodo (Tris 0,20 M pH 8,90). Para la corrida, se aplicó un voltaje entre 110 V y 150 V.

2.5.2.3 Tinción y revelado de geles

Al finalizar la electroforesis, las placas de vidrio fueron retiradas y los geles fueron teñidos con 500 mL de una solución de coloración (0,12 % azul de coomasie R-250; 45,35 % metanol y 4,60 % ácido acético). La tinción se realizó durante 12 h en agitación constante. Se destiñeron los geles en microondas y con una solución de decoloración (50,00 % metanol y 5,00 % ácido acético) en el tiempo requerido para visualizar las bandas definidas (Félix, 2008, p. 125, modificado).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 SELECCIÓN DEL VALOR DE pH DE INMOVILIZACIÓN DE PAPAÍNA

Durante el proceso de inmovilización de la papaína a pH 8, 9, 10 y 11, según la metodología expuesta en el acápite 2.2.2, se determinó la cantidad de proteína presente en el sobrenadante de inmovilización espectrofotométricamente. Este resultado se presenta en la Figura 3.1.

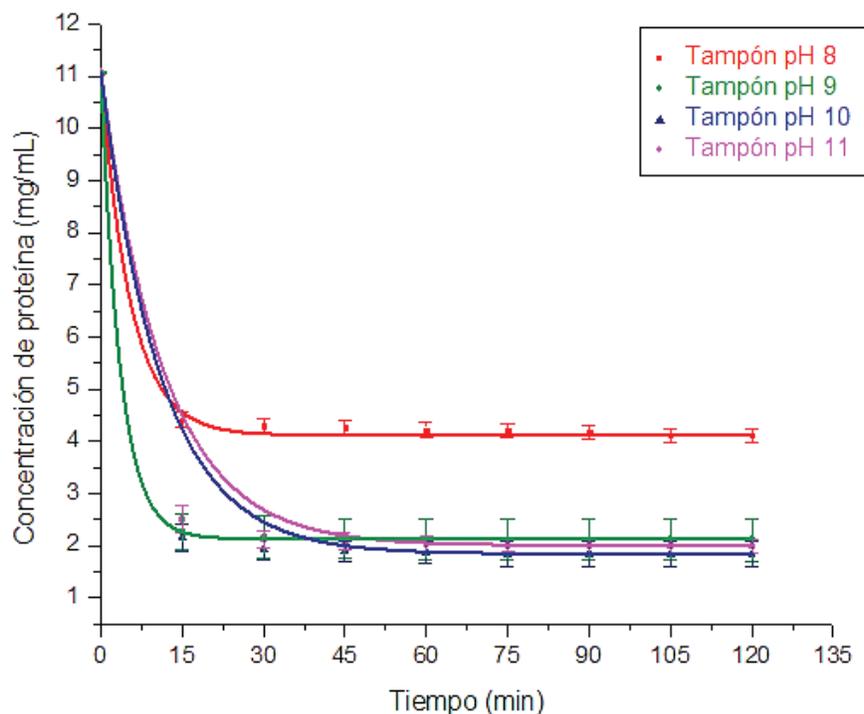


Figura 3.1 Concentración de proteína (mg/mL) en función del tiempo (min) a diferentes valores de pH de inmovilización

En la Figura 3.1 se observa que después de 45 min de incubación se obtuvieron valores prácticamente constantes de concentración de proteína en el sobrenadante, esto indica que la papaína debe permanecer mínimo 45 min en contacto con la glioxil-sepharosa; sin embargo, se dejó inmovilizar durante 2 h

para lograr la estabilización molecular adecuada de la enzima (Cutíño et al., 2014, p. 21).

Además, el análisis de la Figura 3.1 indica que, al inmovilizar papaína a valores de pH de 9, 10 y 11 existe menor concentración de proteína en el sobrenadante, es decir, hay mayor cantidad de papaína enlazada al soporte comparado con el proceso de inmovilización a pH 8. Este resultado fue el esperado porque la incubación se debe realizar a pH alcalino para que la reactividad de los grupos nucleófilos (aminas) de la proteína mejore y así, alcance mayor reacción la enzima con el soporte de inmovilización (Mateo et al., 2007, p. 1 454).

Debido a que las condiciones de incubación y reducción pueden disminuir la actividad enzimática de la enzima inmovilizada (Mateo et al., 2005, p. 276) para la elección del pH de inmovilización se consideraron los criterios que se discuten a continuación.

En la Tabla 3.1 se presentan el porcentaje de enzima inmovilizada (% EI), el porcentaje de retención de actividad funcional (% RAF), el porcentaje de actividad enzimática inmovilizada (% AEI) y la actividad enzimática específica (AEE), obtenidos para los diferentes valores de pH de inmovilización, luego de 2 h de incubación.

Tabla 3.1 % EI, % RAF, % AEI y AEE de papaína inmovilizada en glioxil-sepharosa según el pH de inmovilización

pH de Inmovilización	Variables			
	% EI	% RAF	% AEI	AEE
8	31,07 ± 3,54 ^a	79,42 ± 2,45 ^a	86,82 ± 3,51 ^a	7,22E-05 ± 3,18E-06 ^a
9	68,16 ± 2,19 ^b	53,90 ± 2,82 ^b	88,49 ± 6,03 ^a	5,45E-05 ± 1,39E-05 ^{ab}
10	69,14 ± 2,19 ^b	50,75 ± 2,18 ^b	93,23 ± 2,79 ^a	5,03E-05 ± 2,83E-07 ^b
11	72,31 ± 1,30 ^b	47,02 ± 3,09 ^b	95,40 ± 0,57 ^a	4,83E-05 ± 3,18E-06 ^b

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 2)

Columnas con diferentes letras presentan diferencias estadísticas significativas entre los valores de pH, de acuerdo a la prueba LSD (95 % de confianza)

Los valores de la Tabla 3.1 muestran que, al incrementar el valor del pH de inmovilización, existe un mayor porcentaje de enzima inmovilizada, como consecuencia de la mayor desprotonación de la enzima que favoreció el enlazamiento al soporte (Mateo et al., 2007, p. 1 454). Además, indican que al incrementar la alcalinidad del tampón de inmovilización existe pérdida de la actividad proteolítica de la papaína durante su inmovilización covalente; este comportamiento es característico del tipo de inmovilización utilizado, ya que las condiciones en las cuales se realiza la incubación contribuyen a la desnaturalización de la enzima (Mikkelsen, 2011, p. 89; Ravin, 2010, p. 82).

Según los valores de la Tabla 3.1, al inmovilizar papaína a pH de 9, 10 y 11 la retención de actividad funcional descende, debido a que la reacción de los grupos reactivos de la proteína con el soporte activado pudo ocurrir en las proximidades del sitio activo de la enzima y por tanto, la eficiencia catalítica del producto inmovilizado fue afectada; además, la enzima pudo desnaturalizarse durante el proceso de inmovilización a dichos valores de pH (Cutíño et al., 2014, p. 24; Mikkelsen, 2011, p. 89).

El análisis de varianza para el porcentaje de enzima inmovilizada se presenta en la Tabla 3.2. Se observa que el parámetro p es menor a 0,05 (nivel de confianza del 95 %); por lo tanto, hay diferencia estadística significativa del % EI en cada valor de pH de inmovilización.

Tabla 3.2 Análisis de varianza para el % EI por pH de inmovilización

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2 277,56	3	759,188	127,31	0,0002
Dentro de grupos	23,8528	4	5,9631		
Total (Corr.)	2 301,42	7			

Entonces, con el análisis estadístico de la Tabla 3.2, en conjunto con lo presentado en la Figura 3.1, se concluye que efectivamente, el pH de inmovilización influye sobre la cantidad de enzima inmovilizada.

En la Tabla 3.3 se presenta el análisis de varianza para el % RAF, con un nivel de confianza del 95 %. Se observa que el parámetro p es menor a 0,05; esto indica que existe una diferencia significativa entre los valores del % RAF obtenidos a los diferentes niveles de pH de inmovilización analizados.

El análisis estadístico indica que el pH de inmovilización influye sobre la retención de actividad funcional que tiene la papaína después del proceso de inmovilización.

Tabla 3.3 Análisis de varianza para el % RAF por pH de inmovilización

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1 297,08	3	432,362	61,10	0,0008
Dentro de grupos	28,303	4	7,07575		
Total (Corr.)	1 325,39	7			

El análisis de varianza para el porcentaje de actividad enzimática inmovilizada se presenta en la Tabla 3.4 e indica que no existe diferencia significativa entre los valores para esta variable en los diferentes niveles de pH estudiados ($p > 0,05$) con un nivel de confianza del 95 %.

Tabla 3.4 Análisis de varianza para el % AEI por pH de inmovilización

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	96,2973	3	32,0991	2,26	0,2238
Dentro de grupos	56,8522	4	14,213		
Total (Corr.)	153,149	7			

Finalmente, la Tabla 3.5 resume el análisis de varianza para la actividad enzimática específica e indica que no existe diferencia estadística significativa entre los valores de la AEE para los niveles de pH (valor $p > 0,05$) a un 95 % de confianza.

Tabla 3.5 Análisis de varianza para la AEE por pH de inmovilización

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	7,1053E-10	3	2,36843E-10	4,46	0,0913
Dentro de grupos	2,1241E-10	4	5,31025E-11		
Total (Corr.)	9,2294E-10	7			

En resumen, el % RAF y el % EI presentaron diferencia estadística significativa; es decir, el valor de pH influye sobre estas variables en el resultado del proceso de inmovilización; en tanto que, el porcentaje de actividad enzimática inmovilizado y la actividad enzimática específica no presentaron diferencias estadísticamente significativas. En la Tabla 3.1 se observa también que el valor del % RAF es mayor cuando se trabaja con un pH de inmovilización igual a 8. Este resultado es consistente con el trabajo realizado por Cutiño et al. (2014) que determinaron que la papaína puede retener hasta el 50 % de su actividad funcional después de ser inmovilizada a valores de pH neutro-alcalinos y también es fuertemente estable a pH 8 (p. 24).

Si bien al inmovilizar a pH de 11 se obtuvo un alto porcentaje de enzima inmovilizada, el porcentaje de retención de actividad funcional fue bajo. Este último parámetro es más importante pues indica que la papaína está en capacidad de unirse al sustrato para ejercer su actividad de catálisis. Por ello, se decidió inmovilizar papaína a pH 8, porque bajo esta condición se obtuvo un valor alto de porcentaje de retención de actividad funcional (% RAF) que consecuentemente, favorecerá el grado de purificación de inhibidores en la cromatografía de afinidad.

3.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL PROCESO DE REDUCCIÓN CON NaBH₄

Con el pH de inmovilización seleccionado en el acápite 3.1, se evaluó el efecto del

proceso de reducción con NaBH_4 sobre el porcentaje de retención de actividad funcional (% RAF).

En la Tabla 3.6 se observan los valores del % RAF obtenidos en los diferentes tratamientos con los que se evaluó el proceso de reducción.

Tabla 3.6 % RAF de papaína inmovilizada en glioxil-sepharosa en los diferentes tratamientos de reducción con NaBH_4

Tratamiento			% RAF
Código	Concentración de NaBH_4 (mg/mL gel)	Forma de adición	
T1	10,00	Directa	54,59 ± 6,07
T2	10,00	En solución refrigerada	75,33 ± 5,80
T3	5,00	Directa	77,04 ± 4,46
T4	5,00	En solución refrigerada	80,67 ± 4,23

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 2)

El análisis de varianza para el % RAF se presenta en la Tabla 3.7. En este caso, el valor de p es menor a 0,05 y, por tanto, existe diferencia significativa en la variable de salida debido a los tratamientos.

Tabla 3.7 Análisis de varianza para el % RAF por proceso de reducción

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	765,596	3	255,199	10,58	0,0226
Dentro de grupos	96,4512	4	24,1128		
Total (Corr.)	862,047	7			

Para identificar los tratamientos que son estadísticamente iguales o diferentes se realizó el gráfico de medias e intervalos LSD de la Figura 3.2. En la gráfica, se observa que los tratamientos T2, T3 y T4 son estadísticamente iguales y el tratamiento T1 es diferente. Además, se identifica que con el tratamiento T1 se alcanzó menor porcentaje de retención de actividad funcional de la papaína.

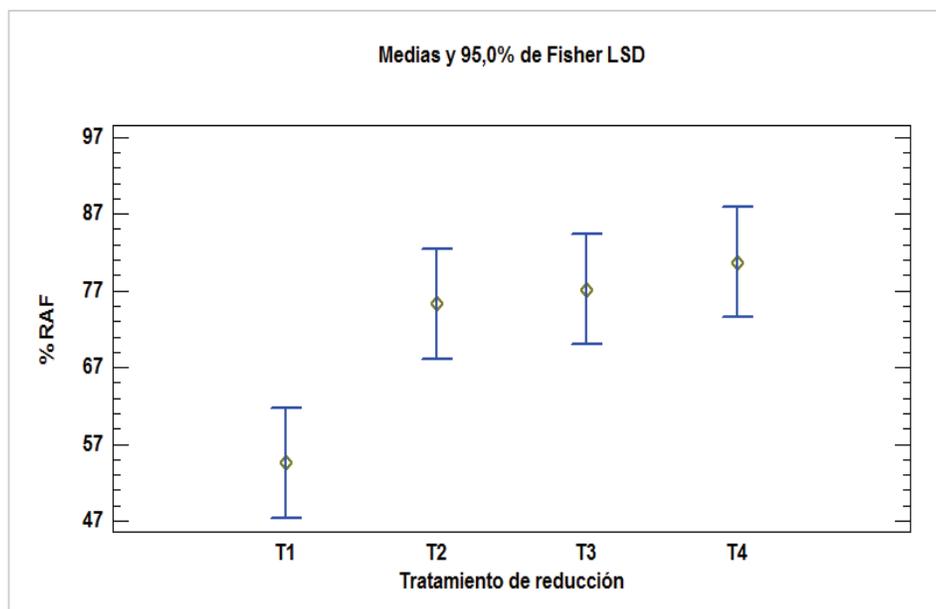


Figura 3.2 Gráfico de medias e intervalos LSD del proceso de reducción del producto inmovilizado sobre el porcentaje de retención de actividad funcional (% RAF).

Después del ataque nucleofílico que ocurre durante el proceso de inmovilización (Mateo et al., 2007, p. 1 454), se da lugar a la formación de bases de Schiff y con el proceso de reducción se forman enlaces covalentes y estables entre la enzima y el soporte (Penzol, 1996, p. 6); sin embargo, las condiciones de reducción utilizadas pueden alterar la estructura tridimensional de la enzima (Blanco y Guisán, 1989, p. 363) y afectar la actividad funcional en el inmovilizado papaína glioxil-sepharosa, como se observa en la Figura 3.2 y en la Tabla 3.6.

La pérdida de la actividad proteolítica del producto inmovilizado puede ser resultado de una posible desnaturalización debido a la agitación por largos periodos durante la inmovilización (Daniel, Toogood y Bergquist, 1995, p. 52; Simon, László, Kotormán y Szajáni, 2001, p. 45).

Durante la reducción del producto inmovilizado para los tratamientos T1 y T3 se colocaron de forma directa 10 y 5 mg mL⁻¹ de NaBH₄, respectivamente. La adición directa del reductor disminuyó el % RAF del derivado porque estas moléculas pueden causar deterioros inmediatos sobre la estructura de la proteína como la ruptura de los enlaces disulfuros o de los enlaces peptídicos y la reducción de

grupos funcionales de las cadenas laterales del centro activo (Light y Sinha, 1967, p. 1 358). En los tratamientos T2 y T4 se colocó NaBH_4 disuelto en solución refrigerada. La retención de la actividad funcional en estos preparados inmovilizados fue mayor e indica que los grupos aldehídos restantes en la matriz activada fueron reducidos con mayor facilidad a grupos hidroxilos inertes (Penzol, 1996, p. 6). La adición del reductor de forma disuelta evitó que ocurra una reacción agresiva entre el soporte inmovilizado y el borohidruro de sodio.

El comportamiento obtenido en los procesos de reducción estudiados es similar al encontrado en la investigación realizada por Castillo (2003), que evaluó el efecto del NaBH_4 sobre la aminoacilasa de riñón porcino inmovilizada con el mismo método y determinó que al añadir directamente el reductor la actividad decrece hasta un 69,80 %; mientras que al añadir NaBH_4 de forma diluida solo se pierde el 45,40 % de actividad funcional (p. 86).

Se decidió reducir la papaína inmovilizada con 5 mg mL^{-1} de NaBH_4 , añadidos en solución tampón pues resultó ser el tratamiento que permite obtener un mayor valor del % RAF con un menor consumo de reductor y con el cual se evitaría una pérdida del 22 % de actividad.

3.3 PURIFICACIÓN DE LAS FRACCIONES INHIBIDORAS MÁS ACTIVAS DE PAPAÍNA

3.3.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ACUOSOS DE LAS SEMILLAS

Los extractos acuosos de las semillas de amaranto (*Amaranthus caudatus* L., var. I-Alegría), arveja (*Pisium sativum*, var. I-432-Lojanita), chocho (*Lupinus mutabilis*, var. I-450-Andino), fréjol (*Phaseolus vulgaris*, var. I-481-Rojo del valle), quinua (*Chenopodium quinoa*, var. I-Tunkanhuan) y sangorache (*Amaranthus hybridus* L.) se obtuvieron a partir de harina desengrasada. El proceso de separación de grasa se realizó de acuerdo con lo descrito en el apartado 2.4.1.

Los valores estimados de la grasa removida se exponen en la Tabla 3.8; se calcularon a partir de la tabla de composición nutricional del INIAP para cada variedad utilizada. Según esa información, el contenido de grasa es de 8,78 % para el amaranto, 4,00 % para la arveja, 19,07 % para el chocho, 3,35 % para el fréjol, 6,11 % para la quinua y 7,00 % para el sangorache.

Tabla 3.8 Porcentaje de grasa removida en cada semilla con 1-propanol como solvente

Semilla	Masa inicial (g)	Masa final (g)	Grasa cruda removida (%)
Amaranto	50,00	47,12	65,60
Arveja	50,00	48,23	88,50
Chocho	50,00	43,12	72,16
Fréjol	50,00	48,98	60,90
Quinua	50,00	47,31	88,05
Sangorache	50,00	46,70	94,29

En la obtención de inhibidores de proteasas, el desengrasado de harinas es importante porque la grasa puede interferir en la determinación de la actividad inhibidora. Por ejemplo, en el estudio de Molina, Blanco y Zamora (2011), el extracto acuoso de *Lupinus bogotensis* con harina desengrasada presentó una inhibición (8,764 UI) estadísticamente significativa superior a los tratamientos con harina sin desengrasar (2,572 UI) sobre aspártico proteasas (p. 184).

Además, el proceso de desengrasado permite eliminar sustancias no proteicas que pueden interferir en las lecturas de absorbancia a 280 nm y así obtener un resultado más confiable. García (2004, p. 10) corroboró este efecto pues determinó que la harina de soya cruda contiene alrededor de 35 mg de inhibidor/g de proteína, pero luego de eliminar la grasa obtuvo un valor de 58 mg de inhibidor/g de proteína.

Los extractos acuosos fueron obtenidos a partir de harina desengrasada según el procedimiento del acápite 2.4.1. En cada extracto se determinó la concentración

de proteína soluble mediante espectrofotometría UV a 280 nm. Los resultados de esta medición se muestran en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9 Concentración de proteína soluble en cada extracto

Extracto acuoso	[P] (mg/mL)
Amaranto	4,14 ± 1,09
Arveja	4,45 ± 1,21
Chocho	22,58 ± 2,52
Fréjol	7,54 ± 1,47
Quinoa	18,47 ± 3,98
Sangorache	2,99 ± 0,19

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 3)

Muñoz (2011) determinó la concentración de proteínas en permeados de las mismas variedades de ciertas semillas utilizadas en esta investigación. Encontró que la arveja tenía una concentración de proteína de 10,69 mg/mL, el chocho de 34,20 mg/mL y el fréjol de 13,41 mg/mL. Las fracciones utilizadas en la investigación de Muñoz (2011) muestran una mayor concentración de proteína que las muestras aquí tratadas. Esta diferencia puede ser resultado del método de extracción utilizado. Muñoz (2011) no realizó el proceso de desengrasado de las harinas de las semillas y consecuentemente, pudo presentar interferencias en las lecturas de absorbancia a 280 nm. Además, los extractos acuosos de esta investigación fueron ultracentrifugados con membranas de 50 kDa con lo cual se logró eliminar a aquellas moléculas con tamaños superiores a dicho valor.

En el trabajo desarrollado por Jácome (2015) se utilizaron cinco de las variedades de las semillas en estudio, la harina de las mismas fue desengrasada y denominó extracto crudo o acuoso a las fracciones de tamaño menor a 50 kDa. Bajo estas condiciones la concentración de proteína fue de 9,40 mg/mL para el amaranto, 9,59 mg/mL para arveja, 28,63 mg/mL para el chocho, 11,63 mg/mL para el fréjol y 5,12 mg/mL para el sangorache. Los valores reportados en la Tabla 3.9 muestran variaciones que pueden ser resultado de factores como el estado y

conservación de las semillas, condiciones de ensayo e incluso factores agronómicos como forma de cultivo, año o época de cosecha, etc.

3.3.2 SELECCIÓN DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS CON ACTIVIDAD INHIBIDORA SOBRE PAPAÍNA

3.3.2.1 Determinación de la actividad inhibidora y actividad inhibidora específica de extractos acuosos

Se determinó la actividad inhibidora y actividad inhibidora específica de cada extracto frente a papaína, con p-NPA como sustrato, según se describe en la sección 2.4.2. Dichos resultados se presentan en la Tabla 3.10 e indican que, todos los extractos presentaron inhibición, excepto el de quinua. El extracto de chocho presentó la mayor actividad inhibidora de papaína (68 % de inhibición), seguido por el del fréjol con un 39 % de inhibición, amaranto con una inhibición del 29 % y sangorache con el 19 % de actividad inhibidora, frente a papaína.

Tabla 3.10 Actividad inhibidora y actividad inhibidora específica de los extractos frente a papaína, con p-NPA como sustrato

Extracto acuoso	AE _{Papaína} (mU/mL)	AI (mU/mL)	AIE (mU/mg)
Amaranto	3,961 ± 0,216	1,177 ± 0,057 ^{ad}	0,297 ± 0,072 ^a
Arveja		0,474 ± 0,072 ^b	0,121 ± 0,042 ^b
Chocho		2,722 ± 0,156 ^c	0,118 ± 0,005 ^b
Fréjol		1,556 ± 0,542 ^d	0,259 ± 0,115 ^a
Quinua		0,000 ± 0,000 ^e	0,000 ± 0,000 ^c
Sangorache		0,761 ± 0,149 ^{ab}	0,249 ± 0,029 ^a

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 3)

Columnas con diferentes letras presentan diferencias estadísticas significativas, de acuerdo a la prueba LSD (95 % de confianza)

La alta actividad inhibidora del chocho encontrada es un resultado conocido por la presencia de lupanina, que es un alcaloide que inhibe proteasas. Por ejemplo, en la especie *Lupinus luteus* se halló un bajo contenido de inhibidores de tripsina que después del proceso de remoción de lupanina disminuyó considerablemente

(Martínez, Frías y Vidal, 2005, p. 295); sin embargo, el contenido inicial de IPP encontrado en dicho estudio es bajo en comparación con otras semillas de leguminosas como la soya (White, Campbel y McDowel, 2000).

Por otra parte, el extracto de quinua no presentó inhibición sobre papaína. Este resultado coincide con el estudio realizado por Ruales y Nair, quienes concluyeron que la actividad de inhibición proteolítica de este pseudocereal es demasiado baja como para reducir la biodisponibilidad de ciertas proteasas (1992, p. 3). Además, en una segunda experimentación Ruales y Nair (1993, p. 141) utilizaron un método cualitativo para determinar la presencia de inhibidores de proteasas en extractos concentrados de quinua con el que no se detectó algún inhibidor.

Por su parte, Romero (1981) analizó ocho variedades de la quinua y encontró valores de inhibición entre 1,36 y 5,04 TUI/mg para la tripsina; sin embargo, estos valores son inferiores a los reportados, por el mismo autor, para otras especies como soya (41,50 TUI/mg) y fréjol (17,80 TUI/mg).

En la Tabla 3.10 también se encuentran los valores de la actividad inhibidora específica AIE de los diferentes extractos sobre papaína. La AIE relaciona la actividad inhibidora con la concentración de proteína de cada extracto. Así, el extracto crudo de chocho presenta el menor valor de AIE pues, como se expuso en la Tabla 3.9, el contenido de proteína para esta leguminosa es elevado.

Los extractos de amaranto, sangorache y fréjol presentaron la mayor AIE y según la prueba LSD aplicada no tienen diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95 %.

En el trabajo de Hernández et al. (2013) se estudió la inhibición de las variedades de las semillas utilizadas en esta investigación; pero en su experimentación aplicaron diferentes métodos de obtención de extractos y en los ensayos enzimáticos emplearon L-piroglutamil-L-fenilalanil-L-leucina-p-nitroanilida como sustrato. Hernández et al. (2013) encontraron que el extracto crudo de fréjol presentó mayor AIE para la papaína ($11,8 \pm 3,5$ mU/mg), seguido por el de

sangorache ($10,4 \pm 1,2$ mU/mg) y el de amaranto ($9,2 \pm 1,3$ mU/mg). A más de las condiciones en los ensayos enzimáticos, esta variación puede ser el resultado de la concentración de inhibidores que obtuvieron por volumen de extracto; la misma que fue mayor respecto a la de esta investigación.

Jácome (2015) encontró mayor valor de AIE sobre papaína con caseína como sustrato en el fréjol, arveja y sangorache con $4,95 \pm 0,95$ U/mg, $3,24 \pm 0,12$ U/mg y $2,58 \pm 0,13$ U/mg, respectivamente (p. 60). Pese a las diferentes metodologías empleadas en el estudio de Hernández et al. (2013), Jácome (2015) y en el de este trabajo, se encontró la presencia de inhibidores de papaína en los extractos de amaranto, arveja, chocho, fréjol y sangorache. De ellos los de fréjol y amaranto presentaron la mayor AIE, por lo que se seleccionaron estos dos extractos para las siguientes etapas de purificación y caracterización.

3.3.3 PURIFICACIÓN PARCIAL DE LOS INHIBIDORES MÁS ACTIVOS DE PAPAÍNA

Los extractos acuosos de fréjol y amaranto presentaron la mayor actividad inhibidora de papaína, por ello se purificaron parcialmente según lo puntualizado en la sección 2.4.3.

3.3.3.1 Purificación de los inhibidores más activos de papaína, mediante tratamiento calórico

En la Tabla 3.11 se encuentran los valores de la actividad inhibidora, la concentración de proteína y la actividad inhibidora específica para el extracto de fréjol y amaranto, antes y después del tratamiento térmico a 60 °C. También se presenta el análisis estadístico de la prueba de múltiples rangos con el método LSD a un nivel de confianza del 95 %.

Tabla 3.11 Concentración de proteína, actividad inhibidora y actividad inhibidora específica de los extractos, semipurificados con tratamiento térmico

Extracto		[P] (mg/mL)	AI (mU/mL)	AIE (mU/mg)
Amaranto	Antes del tratamiento calórico	4,14 ± 1,09 ^a	1,177 ± 0,067 ^{a b}	0,297 ± 0,072 ^a
	Después del tratamiento calórico	3,60 ± 1,19 ^a	0,821 ± 0,149 ^a	0,247 ± 0,091 ^a
Fréjol	Antes del tratamiento calórico	7,54 ± 1,47 ^b	1,556 ± 0,542 ^b	0,259 ± 0,115 ^a
	Después del tratamiento calórico	7,32 ± 2,21 ^b	1,987 ± 0,398 ^a	0,357 ± 0,039 ^a

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 3)

Columnas con diferentes letras presentan diferencias estadísticas significativas, de acuerdo a la prueba LSD (95 % de confianza)

Para cada extracto se partió de un volumen total de 15,00 mL. Luego de la aplicación del tratamiento calórico a 60 °C, se obtuvieron 13,35 mL de extracto de amaranto y 13,25 mL de extracto de fréjol. La concentración de proteína no presentó diferencias estadísticamente significativas; pese a ello, en la Tabla 3.11 se observa que los valores relativos de esta variable después del tratamiento, disminuyeron en los dos extractos.

Con los valores del volumen de cada fracción y de la concentración de proteína, se realizó el análisis de la cantidad de proteína. Se determinó que con el tratamiento calórico a 60 °C se perdieron aproximadamente 14,04 mg de proteína en el extracto de amaranto y 16,11 mg en el extracto de fréjol. Con base en estos resultados, se concluye que, para la cantidad de proteína, la aplicación del tratamiento térmico tuvo un rendimiento del 77 % para el extracto de amaranto y del 86 % para el de fréjol.

El resultado de este tratamiento es diferente para cada extracto, debido a que la efectividad del tratamiento calórico para la purificación de inhibidores está influenciada por el tipo o variedad de semilla (Van Zuilichem y Van der Poel, 1989, p. 264).

Van Zuilichem y Van der Poel (1989) demostraron que inhibidores de proteasas obtenidos en guisantes de la variedad "Finale" se inactivan por completo sobre los 105 °C; mientras que, los provenientes de la variedad "Rugoso" se inactivan por encima de los 125 °C (p. 264).

Al determinar la actividad inhibidora frente a papaína, se identificó que la aplicación del tratamiento calórico sobre el extracto acuoso de amaranto, tuvo un rendimiento del 62 %. Este efecto está relacionado con la temperatura aplicada. A valores de temperaturas mayores a 50 °C las proteínas comienzan a desnaturalizarse y consecuentemente, su carácter inhibidor se reduce. Al aplicar un tratamiento de 121 °C por 15 min o más se puede conseguir la disminución de la actividad inhibidora de proteasas provenientes de leguminosas (Brenes y Brenes, 1993, p. 10).

No existen diferencias significativas ($p < 0,05$) en la AIE en todos los niveles evaluados; sin embargo, en el extracto de amaranto el valor relativo de la AIE disminuyó después de la aplicación del tratamiento térmico a 60 °C, en este caso en un 17 %. El grado de purificación alcanzado con esta etapa es menor a la unidad, lo que significa que no se tiene efecto positivo y, por lo tanto, se eliminó como etapa de semipurificación del extracto acuoso de amaranto para la obtención de IPP de papaína.

La AIE del extracto de fréjol aumentó después de ser tratado a 60 °C. Se consiguió un grado de purificación de 1,38 que indica que la AIE se incrementó en un 38 %. Por lo tanto, no se eliminó la aplicación del tratamiento calórico en las etapas de semipurificación del extracto acuoso de fréjol.

3.3.3.2 Purificación de los inhibidores más activos de papaína, mediante ultrafiltración centrífuga a 10 kDa

Para la purificación con membranas de 10 kDa se tomaron 15 mL del extracto acuoso de amaranto (< 50 kDa) ya que el tratamiento calórico no aportó en el

grado de purificación de este extracto. Por su parte, se tomaron 15 mL del extracto semipurificado de fréjol con tratamiento térmico a 60 °C. El resultado de esta fase y su respectivo análisis estadístico con una prueba LSD de múltiples rangos, se presenta en la Tabla 3.12. Luego de ultrafiltrar a 10 kDa el extracto de amaranto, se obtuvieron 4,50 mL de retenido y 9,80 mL de permeado. Los volúmenes de retenido y permeado del extracto de fréjol fueron de 3,80 mL y 11,00 mL, respectivamente.

Según los resultados presentados en la Tabla 3.12, en las fracciones retenidas a 10 kDa, los valores relativos de la concentración de proteína son mayores que los de los permeados, tanto para el extracto de amaranto como para el de fréjol.

Tabla 3.12 Concentración de proteína, actividad inhibidora y actividad inhibidora específica del extracto acuoso de amaranto y semipurificado de fréjol, luego de la ultrafiltración a 10 kDa

Extracto		[P] (mg/mL)	AI (mU/mL)	AIE (mU/mg)
Amaranto	Retenido de 10 kDa	5,86 ± 0,52 ^a	0,469 ± 0,091 ^a	0,079 ± 0,011 ^a
	Permeado de 10 kDa	3,17 ± 0,05 ^b	1,297 ± 0,107 ^b	0,409 ± 0,030 ^b
Fréjol	Retenido de 10 kDa	5,86 ± 0,34 ^a	0,748 ± 0,165 ^c	0,127 ± 0,024 ^c
	Permeado de 10 kDa	5,44 ± 0,59 ^a	1,415 ± 0,063 ^b	0,388 ± 0,027 ^b

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 3)

Columnas con diferentes letras presentan diferencias estadísticas significativas, de acuerdo a la prueba LSD (95 % de confianza)

En el trabajo de Echeverría (2014), después de la ultrafiltración a 10 kDa, el permeado del extracto de amaranto tuvo una concentración de proteína igual a $3,90 \pm 0,04$ mg/mL y el permeado de fréjol de $6,49 \pm 0,19$ mg/mL (p. 55); por su parte, Jácome (2015) reportó una concentración proteica del permeado de fréjol igual a $6,73 \pm 0,45$ mg/mL. Estos valores no se aproximan a los resultados presentados en la Tabla 3.12. Esta diferencia puede ser porque Echeverría (2014) y Jácome (2015) aplicaron el fraccionamiento con 10 kDa después de la

obtención del extracto crudo, mientras que, en estos ensayos se aplicó después del tratamiento térmico a 60 °C y con el cual ya se logró remover ciertas proteínas.

El análisis de la cantidad de proteína determinó un porcentaje de pérdida igual a 7 % en el amaranto y del 27 % en el fréjol, luego de la ultrafiltración a 10 kDa. La pérdida de proteína se debe a las condiciones de experimentación durante la extracción de las diferentes fracciones.

Por otra parte, en la Tabla 3.12 también se observa que todas las fracciones presentaron actividad inhibidora frente a papaína. Después de la ultrafiltración con 10 kDa el permeado de fréjol presentó mayor actividad de inhibición con un valor de $1,415 \pm 0,063$ mU/mL, seguido por el permeado de amaranto con AI igual a $1,297 \pm 0,107$ mU/mL.

El análisis de la actividad inhibidora para el extracto acuoso de amaranto determinó una pérdida del 16 %; en el extracto semipurificado de fréjol, la pérdida de AI fue igual al 11 %.

Jácome (2015) también utilizó ultrafiltración con 10 kDa para purificar parcialmente el extracto de fréjol y reportó un valor de actividad inhibidora para la fracción retenida igual a $86,53 \pm 14,34$ U/mL y de $37,22 \pm 2,56$ U/mL para el permeado (p. 71); pese a que los valores absolutos discrepan, debido al sustrato (caseína) que empleó dicho autor, con los encontrados en este trabajo, también se encontró mayor inhibición de papaína en las fracciones permeadas.

Respecto a la actividad inhibidora específica, el permeado de amaranto presentó mayor valor para esta variable ($0,409 \pm 0,030$ mU/mg), seguido por el permeado de fréjol ($0,388 \pm 0,027$ mU/mg), sin diferencias significativas entre estos valores.

Con la aplicación de la ultrafiltración centrífuga a 10 kDa, en los permeados se logró un grado de purificación igual a 1,38 en el extracto de amaranto y de 1,50 en el extracto de fréjol. Por lo expuesto, se seleccionaron a los permeados de 10 kDa de amaranto y fréjol para continuar con la siguiente etapa de purificación.

3.3.3.3 Purificación de los inhibidores más activos de papaína, mediante precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Luego de la semipurificación en las etapas anteriores, se tomaron 8 mL de los extractos de amaranto y fréjol permeados de 10 kDa. Las muestras fueron precipitadas mediante una solución salina de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como se indicó en el apartado 2.4.3. El resultado de esta fase de purificación parcial se presenta en la Tabla 3.13, en la cual se detalla el valor de la concentración de proteína, AI y AIE, con su respectivo análisis estadístico, según el test de múltiples rangos (LSD, 95 % de confianza).

Después de la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se obtuvieron 25 mL del extracto purificado de amaranto y 18 mL del de fréjol. Según los datos de la concentración de proteínas que se indica en la Tabla 3.13 y los respectivos volúmenes se determinó que después de esta fase hubo un rendimiento del 65 % para la cantidad de proteína presente en el extracto de amaranto y del 84 % en el del fréjol. La pérdida de proteína es el resultado de agregar una solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ que provocó que las proteínas de mayor tamaño precipiten después de que los iones hayan ocupado los espacios intersticiales del agua (Green y Hughes, 1995; Duong-Ly y Gabelli, 2014, p. 85).

Tabla 3.13 Concentración de proteína, actividad inhibidora y actividad inhibidora específica de los extractos semipurificados de amaranto y fréjol con precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Extracto		[P] (mg/mL)	AI (mU/mL)	AIE (mU/mg)
Amaranto	Antes de la precipitación salina	3,17 ± 0,05 ^a	1,297 ± 0,107 ^a	0,409 ± 0,030 ^a
	Después de la precipitación salina	0,66 ± 0,10 ^b	0,862 ± 0,087 ^b	0,767 ± 0,119 ^c
Fréjol	Antes de la precipitación salina	5,44 ± 0,59 ^c	1,415 ± 0,063 ^c	0,388 ± 0,027 ^a
	Después de la precipitación salina	2,02 ± 0,88 ^d	0,000 ± 0,000 ^d	0,000 ± 0,000 ^b

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 3)

Columnas con diferentes letras presentan diferencias estadísticas significativas, de acuerdo a la prueba LSD (95 % de confianza)

Además, después de la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se realizó una desalinización de las muestras; este proceso también pudo ocasionar la pérdida de proteína en los extractos.

El análisis estadístico para los datos de la Tabla 3.13 indica que existieron diferencias significativas en la concentración de proteínas, en la actividad inhibidora y en la actividad inhibidora específica, antes y después de la precipitación salina. La precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ favoreció la purificación del extracto semipurificado de amaranto en el que se obtuvo una AIE de $0,767 \pm 0,119$ mU/mg. Así, con este tratamiento se logró alcanzar un grado de purificación igual a 2,58.

Por su parte, el extracto semipurificado de fréjol perdió totalmente la actividad inhibidora frente a papaína, porque bajo las condiciones de saturación del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (30 % - 60 %) y la temperatura del experimento (15 °C), pudieron precipitar las moléculas inhibidoras de papaína. También, las proteínas de interés pudieron desnaturalizarse durante la precipitación salina y consecuentemente, perder actividad inhibidora (Wingfield, 1998, p. 3). Por lo tanto, se descarta este tratamiento del sistema de purificación parcial para el extracto de fréjol.

3.3.4 PURIFICACIÓN SELECTIVA DE LAS FRACCIONES INHIBIDORAS MÁS ACTIVAS DE PAPAÍNA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD, EN UNA MATRIZ DE PAPAÍNA-GLIOXIL-SEPHAROSA

3.3.4.1 Evaluación de la matriz de papaína-glioxil-sepharosa 6B-CL

Las fracciones inhibidoras más activas fueron purificadas selectivamente mediante cromatografía de afinidad con una matriz de papaína-glioxil-sepharosa 6B-CL. Con base en el análisis del apartado 3.1 y 3.2, la matriz se inmovilizó a pH 8 y el producto inmovilizado se redujo con 5 mg/mL de borohidruro de sodio, disuelto en solución tampón.

Quinchuela (2013) preparó una matriz de tripsina-glioxil-sepharosa 6B-CL y concluyó que a valores de pH alcalinos (> 10) se favorece la unión entre la tripsina y el sustrato porque existen más enlaces iminas desprotonados. Reportó un porcentaje de enzima inmovilizado igual a 85,51 % y un porcentaje de retención de actividad funcional de 33,44 %.

Sin embargo, en esta investigación se inmovilizó a un valor de pH igual a 8 y a una temperatura de 4 °C. El producto inmovilizado presentó una actividad enzimática de $9,89 \times 10^{-3}$ U; un % EI de 32,11 y un % RAF de 81,20. Estos resultados indican que, pese a que se logró un bajo porcentaje de inmovilización de papaína, se logró mantener una buena actividad funcional de soporte; consecuentemente, esto favorecería el proceso de purificación de los inhibidores de papaína en la cromatografía de afinidad.

El sitio activo de la papaína contiene una triada catalítica de cisteína (Cys), histidina (His) y asparagina (Asn). Es discutible que únicamente Cys e His sean suficientes para obtener una actividad catalítica completa. Así, His polariza el grupo tiol de Cys para permitir la desprotonación a valores de pH neutro y débilmente ácido, fenómeno que no ocurre en todas las proteasas (Leung, Abbenante y Fairlie, 2000, p. 320). Esto permitió que se logre inmovilizar a pH 8 y conservar la actividad funcional en el producto inmovilizado.

El % RAF obtenido para el preparado de papaína-glioxil-sepharosa 6B-CL fue de 81,20 que es aproximadamente el 18,00 % menor al determinado por Cutiño et al. (2014, p. 25). Esta diferencia se debe a que Cutiño et al. evaluaron el efecto de pH con una carga enzimática (2 mg/g de gel) inferior a la utilizada en esta investigación, con lo cual lograron disminuir las interacciones entre los grupos funcionales de la glioxil-sepharosa con los residuos del centro catalítico de la enzima (2014, p. 21). Echeverría (2014) inmovilizó tripsina en sepharosa y obtuvo un % RAF igual a 21,01. Este valor es inferior al encontrado en esta investigación y pudo deberse a la carga enzimática que utilizó igual a 25 mg/mL_{gel} o a la temperatura de 18 °C a la que inmovilizó y que afectaron la estabilidad del soporte inmovilizado.

3.3.4.2 Cromatografía de afinidad del extracto de fréjol purificado parcialmente

En las Figuras 3.3, 3.4 y 3.5 se observan el cromatograma y las gráficas de actividad inhibidora y actividad inhibidora específica, respectivamente, para el extracto de fréjol purificado en cromatografía de afinidad en una matriz de papaína-glioxil-sepharosa 6B-CL.

Para la purificación de inhibidores de papaína provenientes de fréjol, en la cromatografía de afinidad, se alimentó el extracto previamente purificado mediante tratamiento calórico a 60 °C y ultrafiltración centrífuga a 10 kDa.

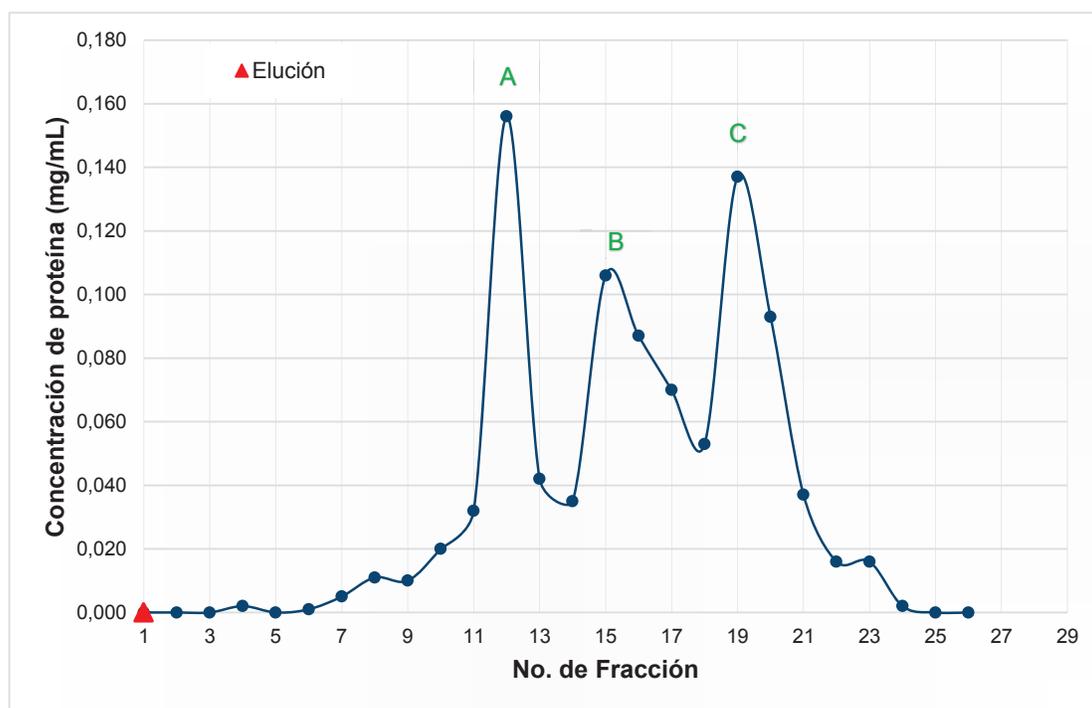


Figura 3.3 Concentración de proteína del extracto semipurificado de fréjol vs. número de fracción recolectada en la cromatografía de afinidad

En el cromatograma de la Figura 3.3 se observa que luego de la elución ácida se forman tres picos; el primer pico (A) formado por las fracciones 10 a 13; el segundo pico (B) desde la 14 a 17 y el tercer pico (C) desde la fracción 18 a la 23. La concentración máxima de proteína en A es igual a 0,156; en B es 0,087 y en el pico C es igual a 0,137 mg/mL.

En la Figura 3.4 se muestra la actividad inhibidora frente a papaína de las fracciones recolectadas después de la cromatografía de afinidad

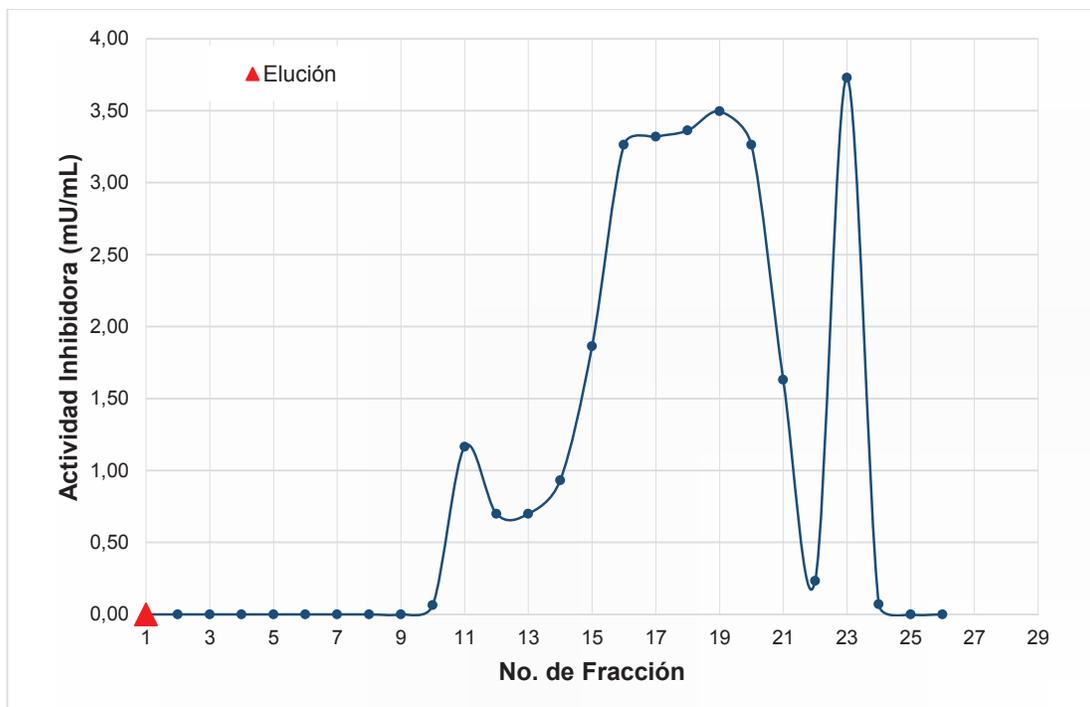


Figura 3.4 Actividad inhibidora del extracto semipurificado de fréjol vs. número de fracción recolectada en la cromatografía de afinidad

Después de la elución ácida, se observa la formación de tres picos que presentaron actividad inhibidora frente a papaína. Las proteínas de estos picos corresponden a aquellas que lograron retenerse en la matriz de afinidad. La fracción más activa es la número 19, con una actividad inhibidora de 3,49 mU/mL; seguida por la número 16, con una actividad inhibidora igual a 3,26 mU/mL. La obtención de tres picos (A, B y C) se podría relacionar con la posible existencia de tres inhibidores presentes en la fracción de alimentación. Esto se confirmará más adelante en la caracterización molecular.

Finalmente, en la Figura 3.5 se muestra la actividad inhibidora específica frente a papaína de las fracciones recolectadas después de la cromatografía de afinidad; se observa que después de la elución ácida se presentan diferentes picos de menor área, correspondientes a inhibidores de papaína más puros. La fracción

con mayor actividad inhibidora específica es la número 23 con 233,01 mU/mg.

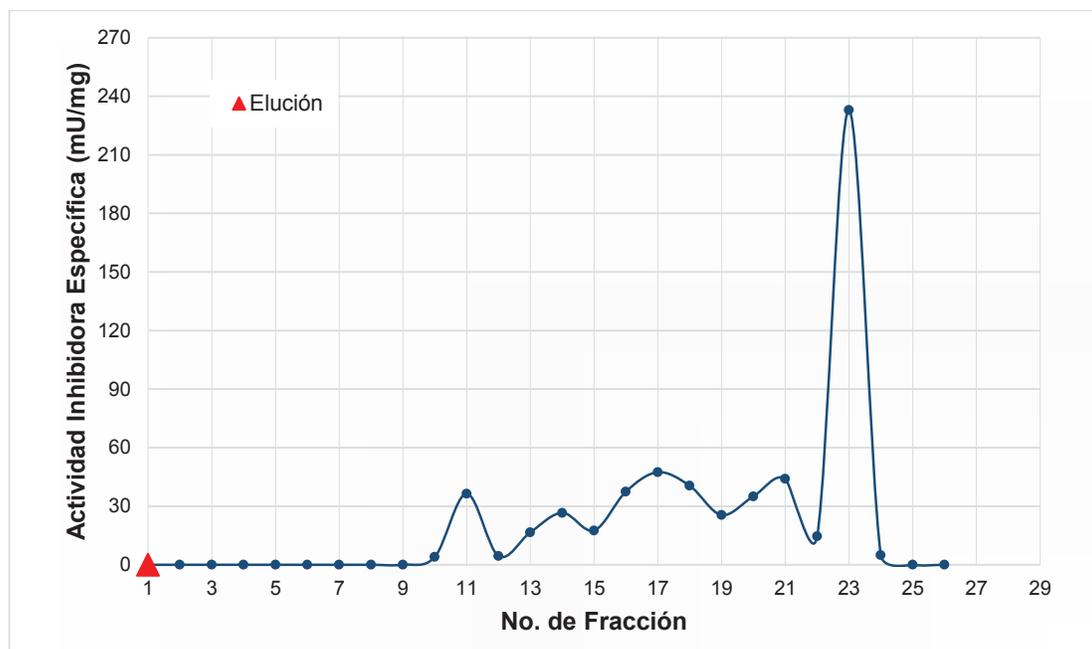


Figura 3.5 Actividad inhibidora específica del extracto semipurificado de fréjol vs. número de fracción recolectada en la cromatografía de afinidad

Jácome (2015) purificó inhibidores de papaína provenientes de fréjol con una matriz de tripsina-glioxil-sepharosa 6B-CL y obtuvo un grado de purificación igual a 1,5 veces. En este estudio se logró mejorar el grado de purificación porque se utilizó una matriz de papaína-glioxil-sepharosa 6B-CL, que purificó selectivamente los inhibidores de papaína. Las fracciones del lote del pico A y B presentaron un GP de 33,32 y las del pico C un GP de 79,10.

3.3.4.3 Cromatografía de afinidad del extracto de amaranto purificado parcialmente

Después de la purificación parcial del extracto acuoso de amaranto con membranas de 10 kDa y precipitación salina, se purificó selectivamente mediante cromatografía de afinidad. En la Figura 3.6 se presenta el cromatograma de la concentración de proteína de la purificación selectiva en una matriz de papaína-glioxil-sepharosa. La Figura 3.7 muestra la actividad inhibidora de papaína del extracto de amaranto purificado mediante cromatografía de afinidad.

En la Figura 3.6, se observa que luego de la elución ácida se formaron dos picos D y E. El pico D tiene una concentración máxima de proteína de 0,106 mg/mL y el pico E presenta una concentración máxima de proteína de 0,031 mg/mL.

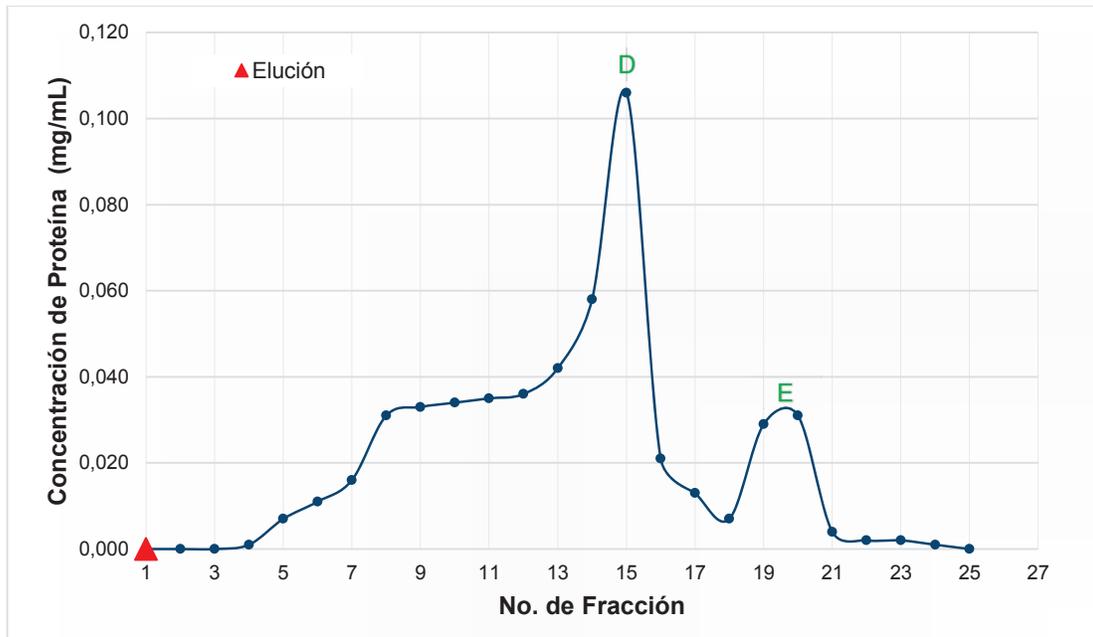


Figura 3.6 Concentración de proteína del extracto semipurificado de amaranto vs. número de fracción recolectada en la cromatografía de afinidad

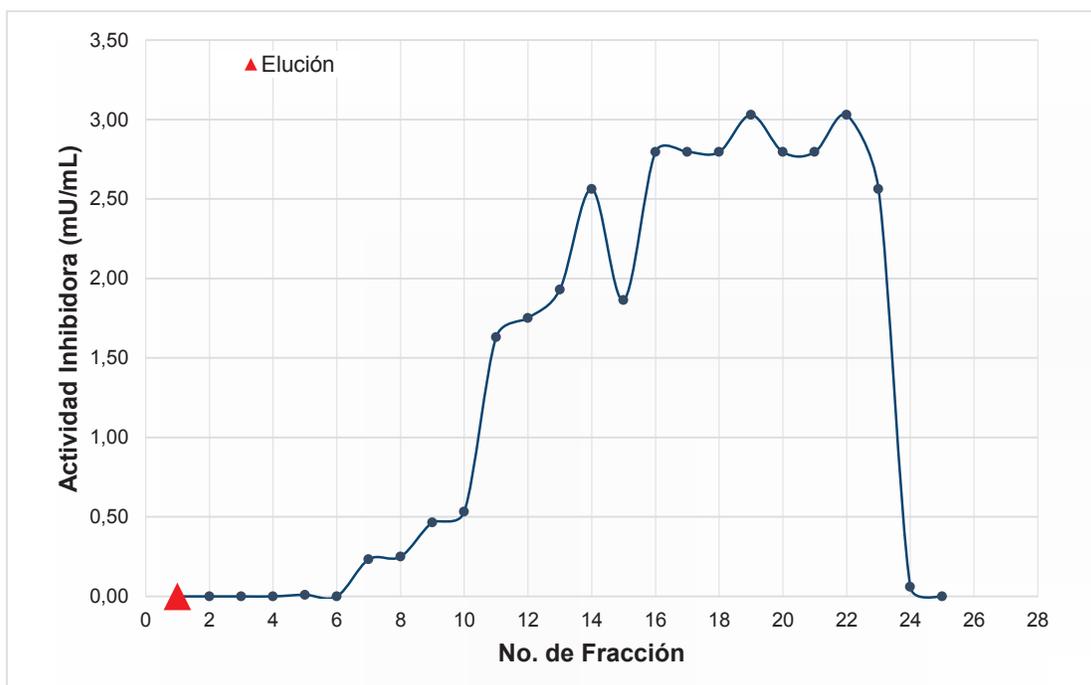


Figura 3.7 Actividad inhibidora del extracto semipurificado de amaranto vs. número de fracción recolectada en la cromatografía de afinidad

Como se observa en la Figura 3.7, las proteínas del pico D y E, sí presentan actividad inhibidora de papaína. En el pico D la fracción 14 presentó la mayor actividad inhibidora de 2,56 mU/mL, mientras que, para el pico E la fracción 22 presentó mayor AI igual a 3,03 mU/mL.

En la Figura 3.8 se presenta el cromatograma de la actividad inhibidora específica de papaína.

Los picos D y E presentan mayor magnitud en lo que concierne a actividad inhibidora específica. Las fracciones número 18 y 22 presentaron mayor AIE con 399,45 mU/mg y 1 514,56 mU/mg, respectivamente.

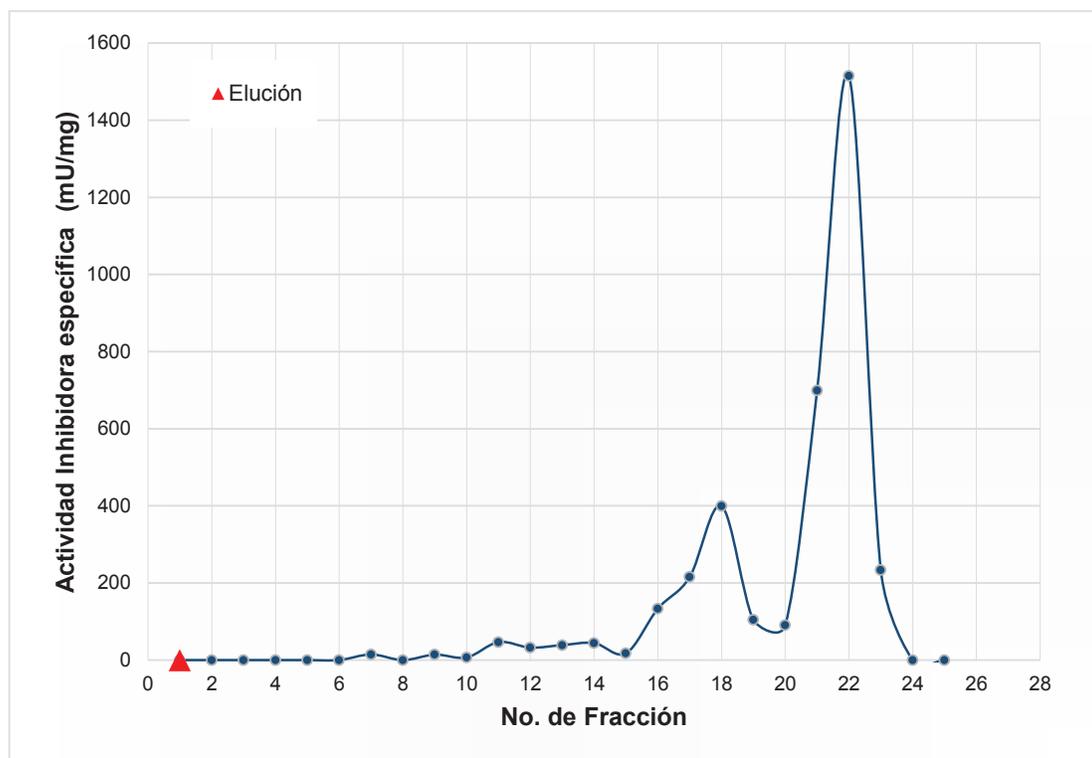


Figura 3.8 Actividad inhibidora específica del extracto semipurificado de amaranto vs. número de fracción recolectada en la cromatografía de afinidad

Estos resultados indican que bajo las condiciones de esta investigación y mediante cromatografía de afinidad, para el extracto de amaranto se logró obtener un grado de purificación de 72,42 veces para el pico D y de 137,54 veces para E.

3.3.5 SISTEMA DE PURIFICACIÓN DE LOS INHIBIDORES MÁS ACTIVOS PRESENTES EN LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE LAS SEMILLAS

La medición de la actividad inhibidora de papaína realizada con los 6 extractos preparados mostró que los extractos provenientes de semillas de fréjol y amaranto presentaron mayor actividad inhibidora específica de papaína, por lo cual fueron seleccionados para ser, inicialmente purificados en forma parcial mediante etapas de tratamiento calórico a 60 °C, ultrafiltración centrífuga con membrana de 10 kDa y precipitación con sulfato de amonio.

Finalmente, la fracción obtenida con el mayor grado de purificación se sometió a una etapa purificación selectiva por cromatografía de afinidad con papaína-glioxil-sepharosa. Se determinó el rendimiento de la cantidad de proteína y de actividad inhibidora en cada etapa.

En la Tabla 3.14, se presentan el rendimiento de proteína, el rendimiento de actividad inhibidora frente a papaína y el grado de purificación alcanzado en cada etapa de purificación parcial y selectiva, del extracto de amaranto.

Tabla 3.14 Etapas de purificación y grado de purificación para el extracto de amaranto

N° Etapa	[P] (mg/mL)	V (mL)	AI (mU/mL)	AIE (mU/mg)	Rendimiento		GP (veces)
					% P	% AI	
1	4,14 ± 1,09	15,0	1,177 ± 0,067	0,297 ± 0,072	100	100	1,00
2	3,17 ± 0,05	9,8	1,297 ± 0,107	0,409 ± 0,030	93	84	1,38
3	0,66 ± 0,10	25,0	0,862 ± 0,087	0,767 ± 0,119	65	207	2,58
4	0,130	36,0	2,796	21,509	8	570	72,42
5	0,053	15,0	2,165	40,849	1	184	137,54

1: Extracto crudo

2: Ultrafiltración a 10 kDa

3: Precipitación con sulfato de amonio

4: Cromatografía de afinidad – Pico D

5: Cromatografía de afinidad – Pico E

Se observa en la Tabla 3.14 que todas las etapas de purificación presentaron pérdidas de la cantidad de proteína. La disminución del rendimiento está

relacionada con las condiciones de experimentación y manipulación de las fracciones en las diferentes etapas. El rendimiento de la actividad inhibidora disminuye en la etapa 2, sin embargo, al igual que las etapas 3, 4 y 5, aporta al grado de purificación de los inhibidores provenientes de amaranto. Por tal motivo, estas fases no se eliminan del sistema de purificación de inhibidores provenientes del extracto de amaranto (< 50 kDa).

El rendimiento de la cantidad de proteína, el rendimiento de la actividad inhibidora de papaína y el grado de purificación, alcanzado en cada etapa de purificación parcial y selectiva del extracto de fréjol, se presenta en la Tabla 3.15.

Tabla 3.15 Etapas de purificación y grado de purificación para el extracto de fréjol

N° Etapa	[P] (mg/mL)	V (mL)	AI (mU/mL)	AIE (mU/mg)	Rendimiento		GP (veces)
					% P	% AI	
1	7,54 ± 7,86	15,0	1,556 ± 0,542	0,259 ± 0,115	100	100	1,00
2	7,32 ± 3,21	13,3	1,987 ± 0,398	0,357 ± 0,039	86	112	1,38
3	5,44 ± 0,59	11,0	1,415 ± 0,063	0,388 ± 0,027	73	89	1,50
4	0,162	24,0	1,398	8,631	3	144	33,32
5	0,091	20,0	1,864	20,484	2	160	79,10

- 1: Extracto crudo (control)
- 2: Tratamiento térmico (60 °C)
- 3: Ultrafiltración a 10 kDa
- 4: Cromatografía de afinidad – Pico A y B
- 5: Cromatografía de afinidad – Pico C

En la Tabla 3.15 se observa que existe disminución en el rendimiento de la cantidad de proteína de la fracción de cada etapa de purificación. Además, la actividad inhibidora de papaína aumenta después de todas las etapas de purificación parcial y de la selectiva, excepto en la etapa 3 que considera únicamente la fracción permeada de 10 kDa.

En resumen, se estableció que el sistema de purificación de inhibidores provenientes de fréjol debe tener etapas de tratamiento calórico, ultrafiltración centrífuga a 10 kDa y cromatografía de afinidad; mientras que, para los inhibidores de papaína del extracto de amaranto se establecieron etapas de

ultrafiltración a 10 kDa, precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y cromatografía de afinidad.

En la Figura 3.9 se muestra el diagrama de bloques para la purificación de inhibidores de papaína presentes en los extractos de semillas de fréjol y amaranto. Los procesos de desengrasado de harina y de obtención de extracto acuoso, se muestran en los diagramas de las Figuras A.I.4.2 y A.I.4.3, respectivamente.

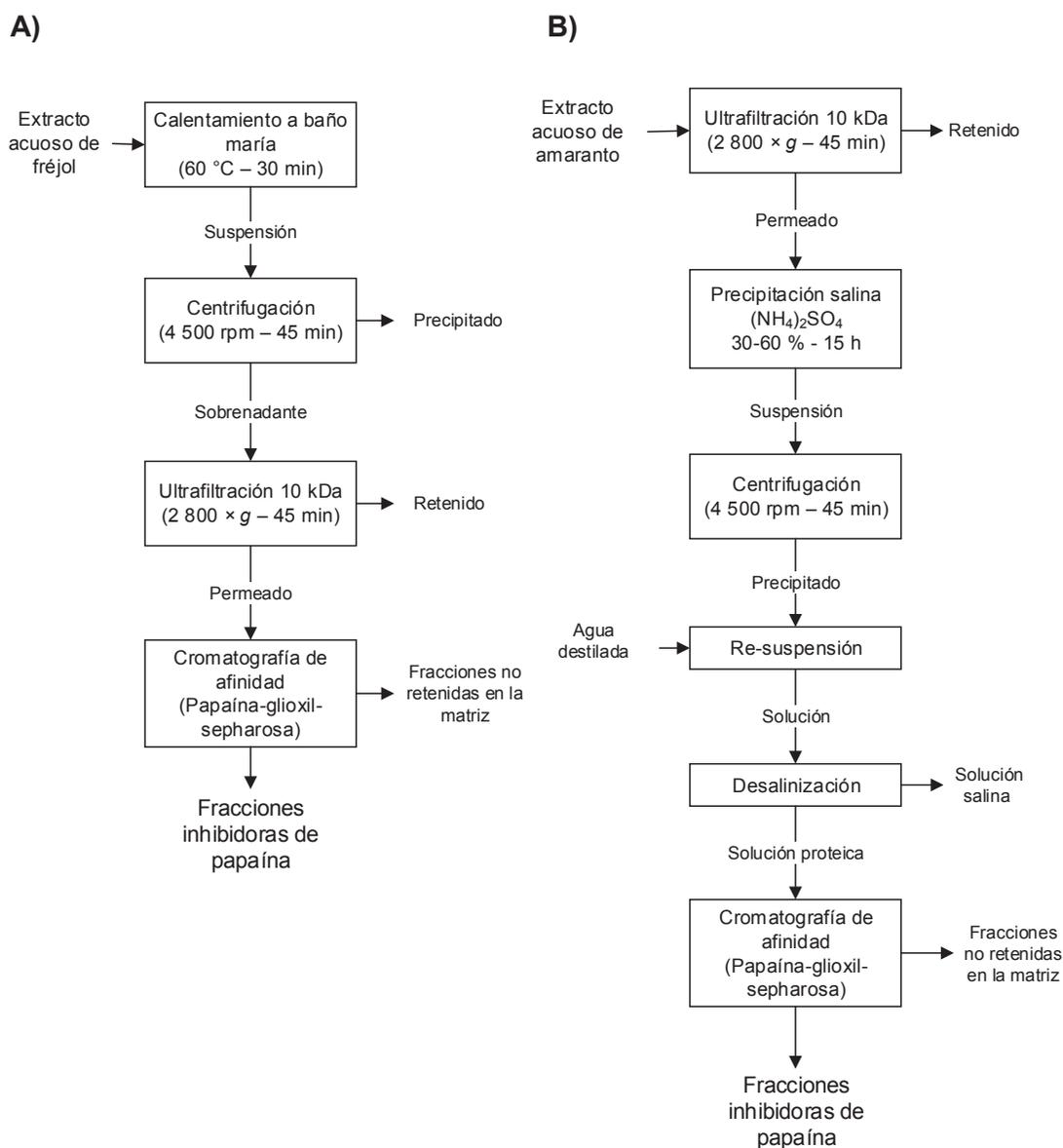


Figura 3.9 Diagrama del sistema de purificación de inhibidores de papaína provenientes de semillas de A) fréjol y B) amaranto

3.4 CARACTERIZACIÓN CINÉTICA Y MOLECULAR DE LAS FRACCIONES INHIBIDORAS MÁS ACTIVAS DE PAPAÍNA

3.4.1 CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LOS INHIBIDORES DE PAPAÍNA PURIFICADOS SELECTIVAMENTE

Para la caracterización cinética de las fracciones inhibidoras, los picos más activos frente a papaína fueron agrupados en lotes. El lote I se formó con las fracciones de los picos A y B; mientras que el lote II estuvo constituido con las fracciones del pico C. Los inhibidores provenientes del extracto de amaranto se agruparon en los lotes III y IV, con las fracciones de los picos de cromatografía D y E, respectivamente.

Se determinó la actividad proteolítica de la papaína en presencia y en ausencia de los lotes inhibidores, con p-NPA, como sustrato, a diferentes concentraciones. Los resultados de estos ensayos enzimáticos con los lotes I y II, se presentan en la siguiente Tabla 3.16.

Tabla 3.16 Actividad enzimática de papaína sin inhibidor y en presencia de los lotes I y II, a diferentes concentraciones de p-NPA

Concentración de p-NPA		Actividad enzimática (U/mL)		
mg/mL	mM	Papaína	Lote I	Lote II
3	0,331	$2,86 \times 10^{-3}$	$1,17 \times 10^{-4}$	$1,97 \times 10^{-4}$
5	0,552	$4,25 \times 10^{-3}$	$1,75 \times 10^{-3}$	$2,93 \times 10^{-3}$
7	0,773	$5,38 \times 10^{-3}$	$2,21 \times 10^{-3}$	$3,70 \times 10^{-3}$
9	0,994	$6,31 \times 10^{-3}$	$2,59 \times 10^{-3}$	$4,35 \times 10^{-3}$
12	1,325	$7,44 \times 10^{-3}$	$3,06 \times 10^{-3}$	$5,12 \times 10^{-3}$

Para determinar si la enzima tiene un comportamiento que se ajusta al modelo de Michaelis-Menten, en la Figura 3.10 se presenta la actividad enzimática de la papaína en ausencia y presencia de los lotes inhibidores I y II, a diferentes concentraciones de sustrato.

Con base en las curvas presentadas en la Figura 3.10 se puede concluir que, a bajas concentraciones de sustrato, la actividad enzimática de la papaína presenta una tendencia lineal. Además, se observa que sobre una concentración de sustrato de 0,50 mM de sustrato existe un cambio de tendencia; en este caso la AE continúa incrementándose, pero de forma menos pronunciada y que tiende asintóticamente a su valor máximo.

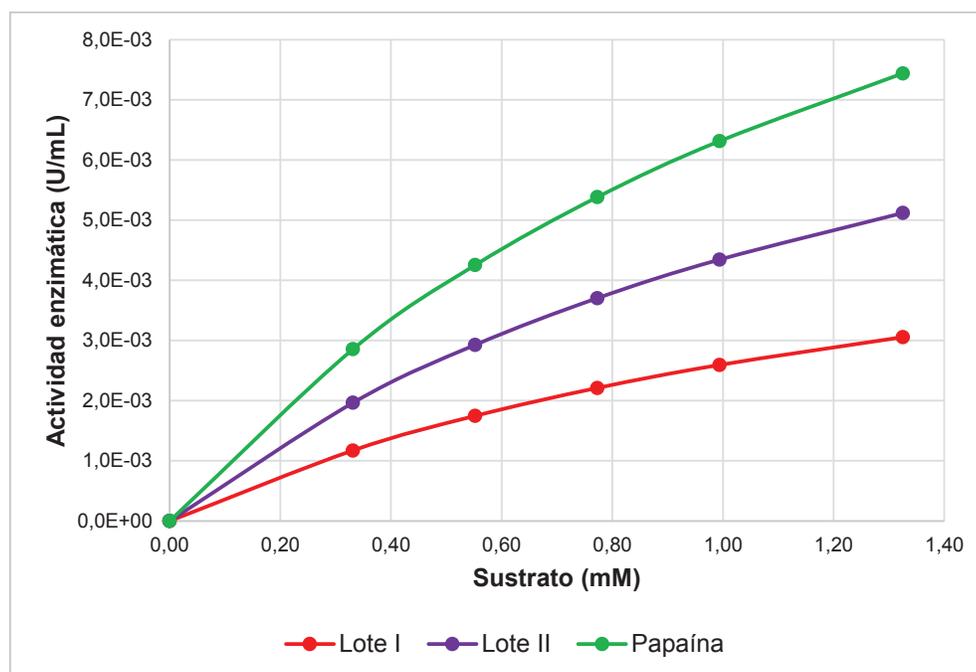


Figura 3.10 Actividad enzimática de papaína sin inhibidor y con lotes I y II, a diferentes concentraciones de p-NPA

El comportamiento de las curvas presentadas en la Figura 3.10 es característico del modelo de Michaelis-Menten, por lo que se procedió a determinar el valor de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ con el método de Lineweaver-Burk, según se indica en el Anexo V.

El gráfico de los dobles recíprocos con su respectiva linealización se muestra en la Figura 3.11, a partir del cual se determinaron los parámetros cinéticos para la papaína sin inhibidor y en presencia de los lotes inhibidores I y II.

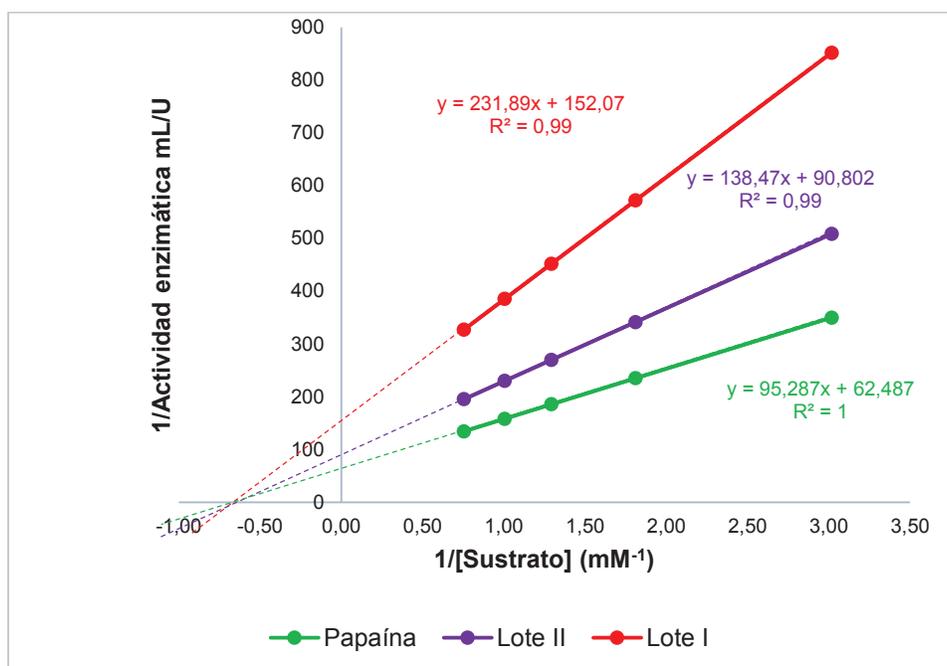


Figura 3.11 Gráficas de los dobles recíprocos para la papaína sin inhibidor y con los lotes inhibidores I y II

En la Tabla 3.17 se presentan los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ para los ensayos de papaína sin inhibidor y con los lotes I y II, provenientes del extracto purificado de fréjol. Los valores de los parámetros cinéticos presentados indican que, en presencia del lote I y del lote II, la velocidad máxima disminuye, con diferencias estadísticas significativas. Además, pese a que los valores relativos de la constante K_m aumentan en presencia de los lotes I y II, el análisis estadístico indica que no existen diferencias entre ellos.

Tabla 3.17 Velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) y constante de Michaelis-Menten (K_m) para la papaína en ausencia y presencia de los lotes inhibidores I y II

Papaína	Parámetros cinéticos	
	$V_{m\acute{a}x}$ (U/mL)	K_m (mM)
Sin Inhibidor	$1,68 \times 10^{-2} \pm 0,01 \times 10^{-2}$ ^a	$1,43 \pm 0,11$ ^a
Con Lote I	$6,52 \times 10^{-3} \pm 0,07 \times 10^{-3}$ ^b	$1,59 \pm 0,13$ ^a
Con Lote II	$1,16 \times 10^{-2} \pm 0,08 \times 10^{-2}$ ^c	$1,56 \pm 0,08$ ^a

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 2)

Columnas con diferentes letras presentan diferencias estadísticas significativas, de acuerdo a la prueba LSD (95 % de confianza)

Estas variaciones que experimentan los parámetros indican que se tiene una inhibición no competitiva (Voet y Voet, 2006, p. 501). En este caso, los lotes inhibidores I y II, bloquean la formación del complejo enzima-sustrato a través de la interacción con los aminoácidos adyacentes al centro activo (Nelson y Cox, 2009, p. 210).

El resultado encontrado es consistente con el reportado por Jácome (2015), quien ensayó la actividad enzimática de papaína en presencia y en ausencia de extractos inhibidores provenientes de fréjol y determinó la presencia de un inhibidor no competitivo (p. 95).

Barret (1987, p. 195) informó que las cistatinas o inhibidores de papaína, en su mayoría tienen una aparente inhibición competitiva reversible; sin embargo, Zhao et al. (1996) reportó la presencia de inhibidores no competitivos de papaína provenientes de soya (p. 1 305). En la investigación realizada por Oukasha (2014) los inhibidores purificados de extractos de cebada también mostraron inhibición no competitiva (p. 11).

De igual forma, se determinó la actividad proteolítica de papaína en presencia y ausencia de los lotes III y IV, del extracto de amaranto. En la Tabla 3.18 se presenta el resultado.

Tabla 3.18 Actividad enzimática de papaína sin inhibidor y en presencia de los lotes III y IV, a diferentes concentraciones de p-NPA

Concentración de p-NPA		Actividad enzimática (U/mL)		
mg/mL	mM	Papaína	Lote III	Lote IV
3	0,331	$2,86 \times 10^{-3}$	$1,29 \times 10^{-3}$	$1,49 \times 10^{-3}$
5	0,552	$4,25 \times 10^{-3}$	$2,03 \times 10^{-3}$	$2,34 \times 10^{-3}$
7	0,773	$5,38 \times 10^{-3}$	$2,69 \times 10^{-3}$	$3,10 \times 10^{-3}$
9	0,994	$6,31 \times 10^{-3}$	$3,29 \times 10^{-3}$	$3,79 \times 10^{-3}$
12	1,325	$7,44 \times 10^{-3}$	$4,06 \times 10^{-3}$	$4,67 \times 10^{-3}$

La gráfica de la actividad proteolítica de la papaína, en presencia y en ausencia de los lotes III y IV provenientes de amaranto, se muestra en la Figura 3.12.

En la Figura 3.12, se observa que a bajas concentraciones de sustrato la actividad enzimática de papaína tiene una tendencia lineal en ausencia y con los lotes inhibidores III y IV provenientes del extracto de amaranto. Además, después de una concentración de p-NPA de 0,40 mM la actividad proteolítica se incrementa de forma menos pronunciada e inicia a tomar una tendencia asintótica.

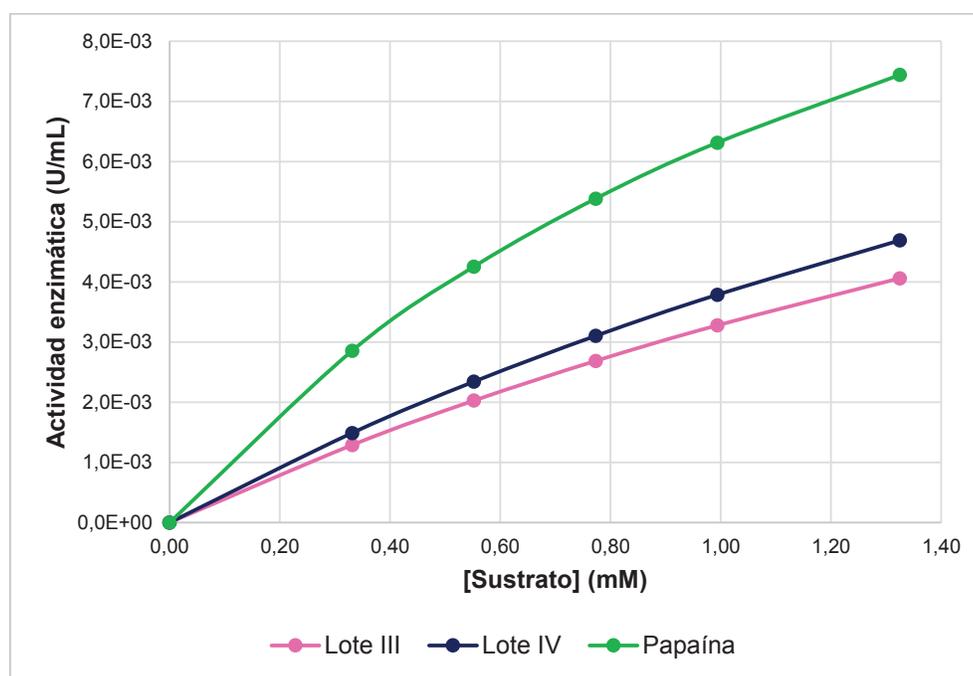


Figura 3.12 Actividad enzimática de papaína sin inhibidor y con lotes III y IV, a diferentes concentraciones de p-NPA

Por presentar un ajuste a la cinética de Michaelis-Menten, se procedió a linealizar la ecuación de dicho modelo a través del método de Lineweaver-Burk. Este resultado se presenta en la Figura 3.13. Luego, con la curva de los dobles recíprocos de la papaína, en ausencia y en presencia de los lotes III y IV, se calcularon los valores de los parámetros cinéticos $V_{\text{máx}}$ y K_m que se muestran en la Tabla 3.19.

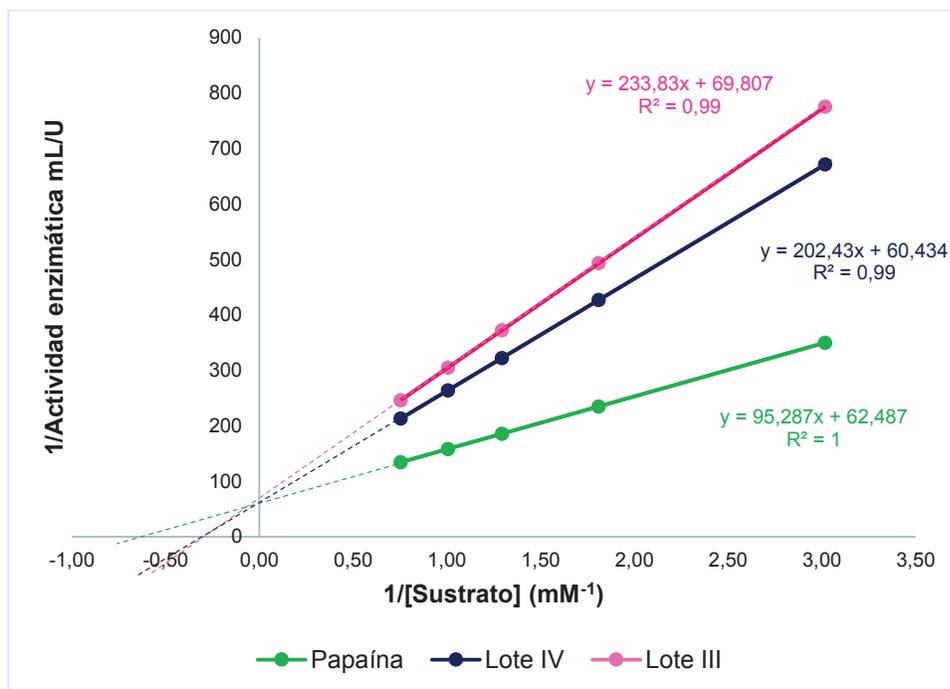


Figura 3.13 Gráficas de los dobles recíprocos para la papaína sin inhibidor y con los lotes inhibidores III y IV

En la Tabla 3.19, se observa que los valores de $V_{m\acute{a}x}$ no tienen diferencias estadísticas significativas (95 % de confianza) pese a las variaciones de sus valores relativos. Por su parte, el valor de K_m en presencia de los lotes III y IV aumenta, sin diferencias significativas entre ellos, pero respecto a la papaína sin inhibidor, sí existen diferencias estadísticas significativas.

Tabla 3.19 Velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) y constante de Michaelis-Menten (K_m) para la papaína en ausencia y presencia de los lotes inhibidores III y IV

Papaína	Parámetros cinéticos	
	$V_{m\acute{a}x}$ (U/mL)	K_m (mM)
Sin Inhibidor	$1,68 \times 10^{-2} \pm 0,01 \times 10^{-2}$ ^a	$1,43 \pm 0,11$ ^a
Con Lote III	$1,50 \times 10^{-2} \pm 0,06 \times 10^{-2}$ ^a	$3,22 \pm 0,11$ ^b
Con Lote IV	$1,70 \times 10^{-2} \pm 0,06 \times 10^{-2}$ ^a	$3,36 \pm 0,08$ ^b

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 2)

Columnas con diferentes letras presentan diferencias estadísticas significativas, de acuerdo a la prueba LSD (95 % de confianza)

En resumen, los datos de la Tabla 3.19 indican que la $V_{m\acute{a}x}$ permanece constante, mientras que, K_m aumenta, en presencia de los lotes III y IV. El incremento del valor de K_m indica que la afinidad de la enzima al sustrato disminuye. Así, estas variaciones muestran que se tiene la presencia de un inhibidor competitivo, que se caracteriza por competir con el sustrato por el centro activo de la enzima (Nelson y Cox, 2009, p. 207). Pese a que la afinidad de las cisteíno proteasas es alta y puede ser difícil demostrar la reversibilidad o competencia de un inhibidor con el sustrato directamente, se ha reportado que hay inhibidores de papaína competitivos y reversibles (Barret, 1987, p. 194; Monti, Contiero y Goulart, 2004, p. 753).

3.4.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS INHIBIDORES DE PAPAÍNA PURIFICADOS SELECTIVAMENTE

La caracterización molecular se realizó mediante electroforesis SDS-PAGE, según lo descrito en la sección 2.5.2. Los lotes se agruparon según la fuente vegetal de procedencia, es decir, fréjol (lote I y II) y amaranto (lote III y IV). Luego, las muestras fueron desalinizadas y liofilizadas, para llegar a la concentración de proteína requerida para la corrida electroforética. En una primera corrida se realizó la identificación de los extractos crudos. El resultado de esta prueba se presenta en la fotografía de la Figura 3.14, en la que se identifican las bandas de tres carriles que corresponden al estándar de proteínas (1), extracto acuoso de amaranto (1) y extracto acuoso de fréjol (2).

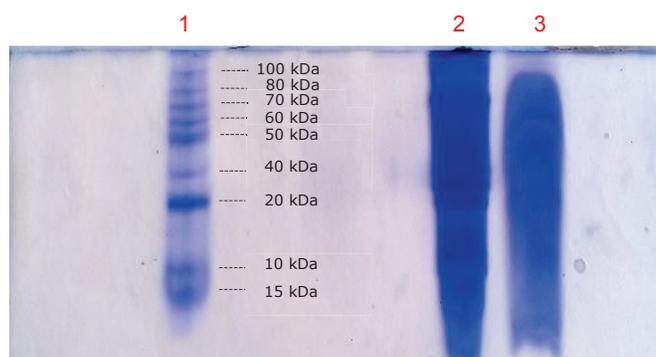


Figura 3.14 Gel de electroforesis SDS-PAGE de los extractos crudos de amaranto y fréjol

Después de realizar un análisis cualitativo de los carriles 2 y 3 de los extractos de amaranto y fréjol, respectivamente, se identifica la presencia de varias bandas juntas y no definidas. Además, al comparar las bandas formadas en los carriles de los extractos crudos (2 y 3) con el carril del estándar (1), se identifica que estos extractos de amaranto y fréjol, tienen una variedad de proteínas menores a 10 kDa y superiores a 100 kDa.

Los inhibidores de amaranto y fréjol, recolectados en la cromatografía de afinidad en papaína-glioxil-sepharosa, fueron identificados mediante electroforesis SDS-PAGE, según lo expuesto en la sección 2.5.2. En la Figura 3.15 se presenta el gel obtenido después de la corrida.

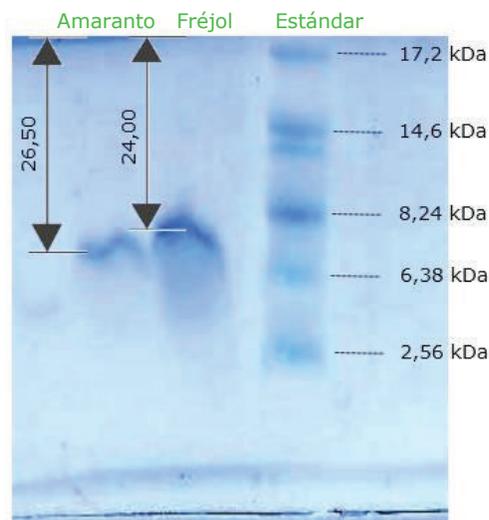


Figura 3.15 Movilidad total de los lotes purificados de fréjol y amaranto y del estándar de proteínas

Se observa en la Figura 3.15 que los inhibidores de amaranto presentaron la formación de una banda, con una movilidad relativa igual a 26,50 mm. Los inhibidores de fréjol presentaron una banda con una movilidad relativa igual a 24,00 mm. La formación de una banda en los diferentes purificados, indica la presencia de un inhibidor.

Para estimar el peso molecular de las muestras se graficó el peso molecular del estándar en función de la movilidad relativa de sus respectivas bandas (Gallo y

Morales, 2006, p. 25). Esta curva de calibración se presenta en la Figura 3.16, en la que se identifica que tiene una tendencia lineal, con un valor de R^2 igual a 0,99.

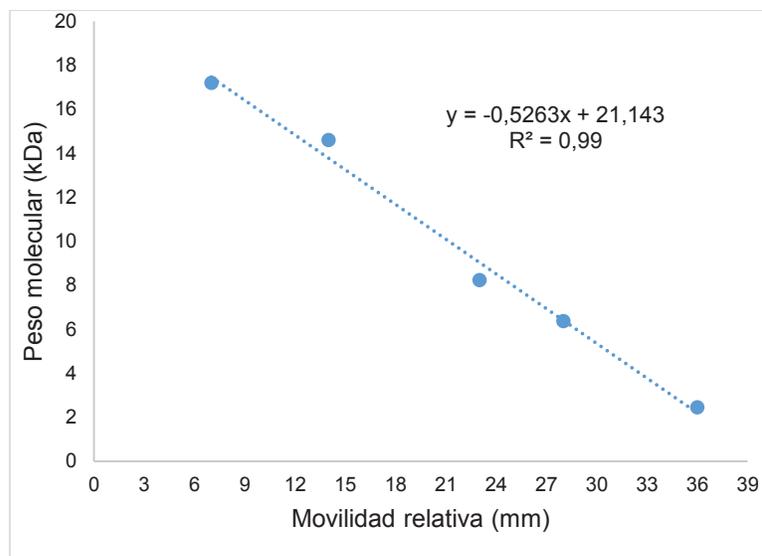


Figura 3.16 Curva de calibración del estándar de electroforesis

Después de reemplazar la movilidad relativa de los extractos purificados en la ecuación de la linealización de la curva de calibración se determinaron sus pesos moleculares. Así, para los inhibidores de amaranto se estima un peso molecular de 7,20 kDa y para los de fréjol de 8,50 kDa.

Finalmente, de acuerdo con el tipo de inhibición encontrado en la sección 3.4.1 y al peso molecular, se determinó el valor de la constante de inhibición para cada lote. El cálculo se realizó según se indica en el Anexo V.

El valor de constante de inhibición (K_i) para el inhibidor del extracto de amaranto es de 0,872 μM y para el de fréjol de 0,058 μM .

Los inhibidores no competitivos encontrados por Zhao et al. (1996) en el extracto de soya presentaron valores de K_i entre 21 y 57 $\times 10^{-3} \mu\text{M}$ (p. 1 305); mientras que, el inhibidor purificado por Oukasha (2014), a partir de extracto de cebada tuvo una K_i de 1,95 $\times 10^{-3} \mu\text{M}$ (p. 11).

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

1. Se seleccionó el valor de pH igual a 8 para la inmovilización de papaína en un soporte de glioxil-sepharosa 6B-CL; bajo esta condición el producto inmovilizado presentó una actividad enzimática de $8,821 \pm 1,51$ mU y un porcentaje de retención de actividad funcional de 79,42 %.
2. El proceso de reducción del producto inmovilizado con NaBH_4 con el que se alcanzó mayor porcentaje de retención de actividad funcional (80,67 %) fue en el que se agregaron 5 mg de $\text{NaBH}_4/\text{mL}_{\text{gel}}$ disueltos en solución tampón refrigerada.
3. Se determinó la actividad inhibidora específica frente a papaína de extractos crudos de amaranto, arveja, chocho, fréjol, quinua y sangorache. Para ser purificados parcialmente y selectivamente se seleccionaron a los extractos de amaranto y fréjol por presentar mayor actividad inhibidora específica frente a papaína, con $0,297 \pm 0,072$ mU/mg y $0,259 \pm 0,115$ mU/mg, respectivamente.
4. Se purificó parcialmente el extracto crudo de amaranto con etapas de ultrafiltración centrífuga a 10 kDa y precipitación con sulfato de amonio (30-60 %), con las que se logró un grado de purificación de 1,38 y 2,58, respectivamente.
5. Se purificó parcialmente el extracto crudo de fréjol mediante etapas de tratamiento calórico a 60 °C y ultrafiltración centrífuga a 10 kDa, con las que se logró un grado de purificación de 1,38 y 1,50, respectivamente.
6. Mediante cromatografía de afinidad con una matriz de papaína-glioxil-sepharosa 6B-CL se logró mejorar el grado de purificación de inhibidores de

papaína provenientes de extractos de amaranto y fréjol, hasta 137,54 y 79,10 veces, respectivamente.

7. Los pesos moleculares, determinados por SDS-PAGE, de los inhibidores de papaína provenientes de amaranto fueron de 7,20 kDa y de fréjol de 8,50 kDa.
8. La caracterización cinética mostró que en el extracto purificado de amaranto existiría un inhibidor competitivo (K_i : 0,872 μ M), mientras que, en el de fréjol se encontró un inhibidor no competitivo (K_i : 0,058 μ M).

4.2 RECOMENDACIONES

1. Analizar la estabilidad y retención de actividad funcional de la matriz papaína-glioxil-sepharosa en el tiempo. Determinar la influencia de la carga enzimática y temperatura sobre los porcentajes de retención de actividad funcional y actividad enzimática inmovilizada en la obtención de papaína-glioxil-sepharosa.
2. Emplear la matriz de papaína-glioxil-sepharosa para la purificación de inhibidores enzimáticos provenientes de semillas diferentes a las estudiadas en esta investigación.
3. Evaluar el efecto de obtención de extractos acuosos de la harina de las semillas con diferentes solventes, sobre la concentración de proteína y la actividad inhibidora de papaína.
4. Evaluar el proceso de extracción de alcaloides del chocho sobre la actividad inhibidora específica de proteasas.
5. Purificar mediante cromatografía de afinidad en una matriz de papaína-glioxil-sepharosa los extractos de sangorache, chocho y arveja que también presentaron actividad inhibidora sobre papaína.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aitken, A. y Learmonth, M. (2002). Protein determination by UV absorption. En Walker, J. (Ed.). *Protocols Handbook*. Totowa, Estados Unidos: Human Press Inc. Recuperado de: http://download.bioon.com.cn/upload/month_0810/20081028_b89a5bd42d711d37fb77m6aaG8vGhQjS.attach.pdf (Diciembre, 2016).
2. Amri, E. y Mamboya, F. (2012). Papain, a plant enzyme of biological importance. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 8 (2), 99-104. doi:10.3844/ajbbbsp.2012.99.104.
3. Anshu, K. (2007). Enhanced production and characterization of a solvent stable protease from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa*. *Enzyme and Microbial Technology*, 42 (1), 11-16. doi: 10.1016/j.enzmictec.2007.07.019
4. Acuña, F. (2006). *Química orgánica*. (1ra. Ed.). San José, Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia.
5. Arias, E. (2012). *Biomoléculas: Una introducción estructural a la Bioquímica* (1ra. Ed.). Salamanca, España: Universidad de Salamanca.
6. Arnon, R. (1970). Papain. En Perlman, G. (Ed.). *Methods in Enzymology*, (pp. 226-244). Nueva York, Estados Unidos: Academia Press.
7. Arroyo, M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, 39 (2), 23-39.
8. Barret, A. (1987). The cystatins: a new class of peptidase inhibitors. *Trends in Biochemistry Science*, 12 (1), 193-196. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0968-0004\(87\)90092-2](http://dx.doi.org/10.1016/0968-0004(87)90092-2)
9. Barret, A. (2001). *Encyclopedia of life sciences: Proteases*. doi: 10.1038/npg.els.0000670

10. Battaner, E. (2000). *Biomoléculas*. Salamanca, España: Universidad de Salamanca.
11. Baynes, J. y Dominiczak, M. (2014). *Bioquímica Médica*. (4ta. Ed.). Barcelona, España: Elsevier.
12. Berg, M., Tymoczko, J. y Stryer L. (2007). *Bioquímica*. (6ta. Ed.). Barcelona, España: Reverté S.A.
13. Bergmeyer, J., Gawehn, K. y Gras, L. (1974). *Methods of Enzymatic Analysis* (2da. ed.). Nueva York, Estados Unidos: Academia Press.
14. Betancourt, E. (2011). *Estudio del proceso de inmovilización de la enzima aminoacilasa I de riñón porcino (ARP) en sepharosa mediante enlace covalente*. (Proyecto de Titulación previo a la obtención del Título de Ingeniero Químico). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.
15. Biasutti, E., De Marco, L., Afonso, W., Silva, V., Lopes, D. y Silvestre, M. (2006). Utilización de dos soportes para la inmovilización de la papaína. *Ars Pharmaceutica*, 47 (4), 425-435.
16. Blanco, R. y Guisán, J. (1989). Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohydride reduction of trypsin-agarose derivatives. *Enzyme and Microbiology Technology*, 11 (6), 360-366. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229\(89\)90020-3](http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229(89)90020-3)
17. Bode, W. y Huber, R. (1991). Natural proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *European Journal of Biochemistry*, 204 (2), 433-451. PMID: 1541261
18. Bonzón, E. (1996). *Obtención de una Matriz de Afinidad de Tripsina-Glioxil-Sepharosa CL-4B para la Purificación del Inhibidor de Proteasas de Stichodactyla heliantus*. Universidad de la Habana, La Habana, Cuba.
19. Botella, M., Xu, Y., Prabha, T., Zhao, Y., Narasimhan, M., Wilson, K., Nielsen, S., Bressan, R. y Hasegawa, P. (1996). Differential

- expression of soybean cysteine proteinase inhibitor genes during development and in response to wounding and methyl jasmonate. *Journal of Plant Physiology*, 112 (3), 1201-1210. PMID: 8938418
20. Brenes, A. y Brenes, J. (1993). *Tratamiento tecnológico de los granos de leguminosas: influencia sobre su valor nutritivo*. Recuperado de: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_agronomia/Procesamiento_de_Granos_de_Leguminosas.pdf (Septiembre, 2016).
 21. Brena, B. y Batista, F. (2006). Immobilization of Enzymes. En: Guisán, J. (Ed.). *Immobilization of Enzymes and Cells* (pp. 15-30). España: Humana Press.
 22. Castillo, P. (2003). *Utilización de aminoacilasa de riñón porcino en la hidrólisis selectiva del derivado 4-acetilado del sulfanilcarbomato de metilo, para producir el principio activo del herbicida Asulam*. (Proyecto de Titulación previo a la obtención del Título de Doctor en Ciencias). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador
 23. Coelho, L., Santos, A., Napoleao, T., Correia, M. y Paiva, P. (2012). *Protein purification by affinity chromatography*. Recuperado de: <http://www.intechopen.com/download/pdf/26596> (Septiembre, 2016).
 24. Cuatrecasas, P. (1970). Protein Purification by Affinity Chromatography. *The Journal of Biological Chemistry*, 245 (12), 3059-3065.
 25. Cutiño, B., Gil D., Aragón, C., Fernández, Y., Hernández, M., Salas, E., Chávez, M., Guisán, J., Díaz, J., Del Monte, A. (2014). Computer-aided design of bromelain and papain covalent immobilization. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16 (1), 19-28. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77631180002> (Junio, 2016).
 26. Daniel, R., Toogood, H. y Berquist, P. (1995). Thermostable Proteases. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 13 (1), 51-100.
 27. Dos Santos, E., De Oliveira, A., Araújo, M., Ferreira, A. y Araújo, A. (2012). Affinity Chromatography as a Key Tool to Purify Protein Protease

- Inhibitors from Plants. En: Magdeldin, S. (Ed.). *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology* (pp. 214-244). doi: 10.5772/34982
28. Duong-Ly, K. y Gabeli, S. (2014). Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation. *Methods in Enzymology*, 541, 86-94. doi: 10.1016/B978-0-12-420119-4.00007-0
 29. Earlander, B., Kokowski, N. y Cohen, W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95(2), 271-278.
 30. Echeverría, P. (2014). *Purificación y Caracterización de Inhibidores de Tripsina Provenientes de Semillas de Amaranto, Arveja, Chocho, Fréjol y Sangorache, mediante Cromatografía de Afinidad*. (Proyecto de Titulación previo a la obtención del Título de Ingeniera Química). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador
 31. Edwin, F. y Jagannadham, M. (2000). Single disulfide bond reduced papain exists in a compact intermediate state. *Biochimica and Biophysica Acta* 1479, 69-82. doi: 10.1016/S0167-4838(00)00062-5.
 32. Elizalde, A., Portilla, Y. y Chaparro, D. (2009). Factores antinutricionales en semillas. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 7 (1), 45-54.
 33. El-Yassin, H. (2012). *Enzymes assay*. Recuperado de: <http://www.comed.uobaghdad.edu.iq/uploads/Lectures/Biochemistry/biochemistry.pdf> (Junio, 2016).
 34. EnCor Biotechnology. (2016). *Ammonium Sulfate Calculator*. Recuperado de: <http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm> (Septiembre, 2016).
 35. Feijoo, L. y Villa, T. (2010). Native and Biotechnologically Engineered Plant Proteases with Industrial Applications. *Food bioprocess Technology*, 1 (4), 1 066 - 1 088. doi: 10.1007/s11947-010-0431-4.
 36. Félix, R. (2008). *Aislamiento, purificación y caracterización de proteasas de origen vegetal, a partir de muestras de hierba mora (Solanum nigrum)*

e *Higuerón (Fivus apollinaris)*. (Proyecto de Titulación previo a la obtención del Título de Ingeniero Químico). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.

37. Fukuda, K., Kuwahata, O., Kirokawa, Y., Yanagiuchi, T., Wakai, Y., Kitamota, K., Inohue, Y. y Kimura, A. (1996). Molecular cloning and nucleotide sequence of the isoamyl acetate-hydrolyzing esterase Gene (EST2) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82 (1), 8-15. doi:10.1016/0922-338X(96)89447-5
38. Gallo, M. y Morales, D. (2006). *Plataformas de proteómica*. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de: http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/plataformas_de_proteomica.pdf (Julio, 2016).
39. Galván, A. y Muñoz, E. (2006). *Diseño de herramientas bioquímicas para la ingeniería molecular de derivados inmovilizados de renina y beta galactosidasa*. Madrid, España: Editorial Universidad Complutense de Madrid.
40. García, H. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: Fundamentos, actualidad e importancia. *UNIV DIAH*, 12 (1), 31-41. Recuperado de: http://bvs.sld.cu/revistas/uni/vol1_2_00/uni07200.pdf (Julio, 2016).
41. García-Fernández, R., Salas, E., Del Monte, A., Del Rivero, A., Guerra, Y. y Chávez, M. (2009). Micro y nano biotecnologías en la detección y caracterización de inhibidores de proteasas de interés biomédico. *Revista Cubana de Física*, 26 (1), 76-82. Recuperado de: <http://www.revistacubanadefisica.org/RCFextradata/OldFiles/2009/vol1.26-No.1/RCF-26-1-2009-76.pdf> (Julio, 2016).
42. García, C. (2014). *Inhibidores de Proteasas en Leguminosas*. Universidad de Valladolid, Valladolid, España. Recuperado de: <https://uvadoc.uva.es/bitstream/10324/7486/1/TFG-M-N170.pdf> (Octubre, 2016).

43. Gomes, C., Barbosa, A., Macedo, L., Pitanga, J., Moura, F., Oliveira, A., Moura, R., Queiroz, A., Macedo, F., Andrade, L., Vidal, M. y Sales, M. (2005). Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus macalauts* and *Ceratitis capitata*. *Plant physiology and biochemistry*, 43 (12), 17111 – 17117. ISSN 0981-9428.
44. Green, A. y Hughes, W. (1995). Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. *Methods in Enzymology*, 1, 67-90. doi: 10.1016/0076-6879(55)01014-8
45. Habib, M. y Majid, K. (2007). Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology*, 2(3), 68-85. Recuperado de: http://www.academicjournals.org/article/article1380100578_Habeeb%20and%20Khalid.pdf (Junio, 2016).
46. Hejgaard, J. (1981). Isoelectric focusing of subtilism inhibitors: detection and partial characterization of cereal inhibitors of chymotrypsin and microbial proteases. *Analytical Biochemistry*, 116 (2), 444-449. doi: 10.1016/0003-2697(81)90386-9
47. Hernández, M., Castillo, P., Muñoz, F., Quinchuela, L., Echeverría, P., Jácome, G., Covalada, G., Trejo, S. y Avilés, F. (2014). *Isolation and purification of protease inhibitors from Latin-American plants*. Recuperado de: https://www.researchgate.net/profile/Martha_De_La_Caridad_Hernandez/publication/284158077_Aislamiento_y_purificacion_de_inhibidores_de_proteasas_a_partir_de plantas_Latinoamericanas/links/564df99508ae4988a7a59df6.pdf?origin=publication_list (Diciembre, 2016).
48. Illanes, A., Álvarez, L. y Álvaro, G. (2008). Esterificación quimioselectiva de fitosteroles de madera mediante lipasas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 5 (1), 17-35. Recuperado de: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/2731636.pdf> (Agosto, 2016).

49. Jácome, G. (2015). *Obtención de Extractos Clarificados y Concentrados de Inhibidores de Proteasas a partir de Semillas de Cereales y Leguminosas Seleccionadas*. (Proyecto de Titulación previo a la obtención del Título de Ingeniero Agroindustrial). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador
50. Jamal, F., Pandey, P. Singh, D. y Khan, M. (2013). Serine protease inhibitors in plants: nature's arsenal crafted for insect predators. *Phytochemistry*, 12 (1), 1-34. doi: 10.1007/s11101-012-9231-y
51. Kalpana, M., Rasheedha, A., Gnanaprabhal, G., Pradeep, B. y Palaniswamy, M. (2008). Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian journal of Science and Technology*, 1 (7), 1-6. doi: 10.17485/ijst/2008/v1i7/29599
52. Kubota, N., Hashimoto, T. y Mori, Y. (2008). Microfiltration and Ultrafiltration. En Li, N., Fane, A., Winston, W. y Matsuura, T. (Ed.). *Advanced Membrane Technology and Applications*. (pp. 101-130). Hoboken, Estados Unidos: John Wiley & Sons.
53. Laskowski, M., Qasim, M. y Lu, S. (2003). Interaction of standard mechanism, canonical protein inhibitors with proteases. *Annual Review of Biochemistry*, 49, 593-626. doi: 10.1007/s00018-003-3120-x
54. Lawrence, P. y Koundal, K. (2002). Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic Journal of Biotechnology*, 5, 93-109. doi: 10.2225/vol5-issue1-fulltext-3
55. Lecaille, F., Kaleta, J., y Bromme, D. (2002). Human and Parasitic Papain-Like Cysteine Proteases: Their Role in Physiology and Pathology and Recent Developments in Inhibitor Design. *Chemical Reviews*, 102 (12), 4459-4488. doi: 10.1021/cr0101656

56. Leung, D., Abbenante, G. y Fairlie, D. (2000). Proteases Inhibitors: Current Status and Future Prospects. *American Chemical Society*, 43 (3), 305-340. doi: 10.1021/jm990412m
57. Light, A. y Sinha, N. (1967). Difference in the Chemical Reactivity of the Disulfide Bonds of Trypsin and Chymotrypsin. *The Journal of Biological Chemistry*, 242 (6), 1358-1359. Recuperado de: <http://www.jbc.org/content/242/6/1358.full.pdf>
58. Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., Zipursky, L. y Darnell, J. (2005). *Biología Celular y Molecular* (5ta Ed.). Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
59. Lomonte, B. (2002). *Electroforesis en gel de poliacrilamida*. Recuperado de <http://www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/lab-bioq-gen/archivos/Lomonte%20-%20Cap13%20PAGE.pdf> (Septiembre, 2016).
60. López, C., y Overall, C. (2002). Protease Degradomics: A new challenge for proteomics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3. doi: 10.1038/nrm858
61. Martínez, C., Frías, J. y Vidal, C. (2005). Functional lupin seeds (*Lupinus albus L. and Lupinus luteus L.*) after extraction of a-galactosides. *Food Chemistry*, 98, 291-299. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.05.074
62. Mateo, C., Palomo, J., Fuentes, M., Betancor, L., Grazu, V., López, F., Pessela, B., Hidalgo, A., Fernández, G., Fernández, R. y Guisán, J. (2005). Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 274-280. doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.10.014
63. Mateo, C., Palomo, J., Fernández, G., Guisán, J. y Fernández, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1451-1463. doi: 10.1016/j.enzmictec.2007.01.018

64. Mikkelsen, S. (2011). *Química Bioanalítica: métodos y teoría analítica para el laboratorio de biología molecular, farmacia y bioquímica*. Argentina: Edueba.
65. Molina, D., Blanco, A. y Zamora, H. (2011). Inhibidores de proteasas de plantas efectivos contra las aspártico proteasas de *Hypothenemus hampei*. *Revista Colombiana de Entomología*, 37 (2), 183-191. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v37n2/v37n2a03.pdf> (Octubre, 2016).
66. Monti, R., Contiero, J. y Goulart, J. (2004). Isolation of Natural Inhibitors of Papain Obtained from *Carica papaya* Latex. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47 (5), 747-754. Recuperado de: <http://www.scielo.br/pdf/babt/v47n5/a10v47n5.pdf> (Enero, 2017).
67. Müller, W. (2004). *Bioquímica* (2da. ed.). Barcelona, España: Reverté.
68. Muñoz F. (2011). *Aislamiento y Purificación de Inhibidores de Tripsina presentes en Semillas de Leguminosas o Gramíneas Producidas en el Ecuador*. (Proyecto de Titulación previo a la obtención del Título de Ingeniera Agroindustrial). Escuela Politécnica Nacional. Quito, Ecuador.
69. Nelson, D. y Cox, M. (2009). *Lehninger Principios de Bioquímica*. (5ta. Ed.) España: Omega.
70. Oliveira, A., Filho, J. y Sales, M. (2003). Cysteine proteinases and cystatins. *Brazilian Archives of Biological Technology*, 46 (1), 91-104. ISSN 1678-4324
71. Oliveira, A., Migliolo, L., Aquino, R., Ribeiro, J., Macedo, L., Andrade, L., Bemquerer, M., Santos, E., Kiyota, S. y Sales, M. (2007). Purification and characterization of a trypsin-papain inhibitor from *Pithecelobium dumosum* seeds and its in vitro effects towards digestive enzymes from insect pests. *Plant physiology and biochemistry*, 45 (10), 858-865. ISSN 0981-9428

72. Penzol, G. (1996). Diseño de Herramientas Bioquímicas para la Ingeniería Molecular de Derivados Inmovilizados de Renina y β -Galactosidasa. (Disertación doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
73. Peretó, J., Sendra, R., Pamblanco, M. y Bañó C. (2007). *Fundamentos de Bioquímica* (2da. ed.). Valencia, España: PUV.
74. Pérez, C. (1996). *Sensores Ópticos*. Valencia, España: Universidad de Valencia.
75. Quibell, M., Taylor, S., Grabawska, U., Nilsson, M. y Morisson, V. (2006). Inhibidores de cisteína proteasa. *Oficina Española de Patentes y Marcas*. Recuperado de: http://www.espatentes.com/pdf/2261341_t3.pdf (Junio, 2016).
76. Quinchuela, L. (2013). *Inmovilización covalente de la tripsina en Sepharosa*. (Proyecto de Titulación previo a la obtención del Título de Ingeniera Química). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador
77. Raj, S., Kibushi, E., Kurasawa, T., Suzuki, A., Yamane, T., Odani, S., Iwasaki, Y., Yamane, T. y Ashida, T. (2002). Crystal structure of bovine trypsin and wheat germ trypsin inhibitor (I-2b) complex (2:1) at 2.3 Å resolution. *Journal of Biochemistry*, 132 (6), 927-933. Recuperado de: <http://jb.oxfordjournals.org/content/132/6/927> (Agosto, 2016).
78. Rao, M., Tanksale, A., Ghatge, M. y Despande, V. (1998). Molecular and Biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology*, 62 (3), 597-635. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98927/> (Agosto, 2016).
79. Ravin, N. (2010). *Engineering Carbohydrate-Based Materials for Biomedical Applications*. New Jersey, Estados Unidos: Wiley.
80. Robert, A. (2005). *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists*. Wiley, Germany.

81. Romero, J. (1981). *Evaluación de las características físicas, químicas y biológicas de ocho variedades de quinoa (Chenopodium quinoa, Willd)*. Universidad de San Carlo de Guatemala.
82. Ruales, J. y Nair, B. (1992). Nutritional quality of the proteins in quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd) seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 42 (1), 1-11. doi: 10.1007/BF02196067
83. Ruales, J. y Nair, B. (1993). Saponins, phytic acid, tannins and protease inhibitors in quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd) seeds. *Food Chemistry*, 48 (2), 137-143. doi: 10.1016/0308-8146(93)90048-K
84. Schagger, H. y Von Jagow, G. (1987). Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166 (2), 368-379. doi: 10.1016/0003-2697(87)90587-2
85. Sigma-Aldrich. (2013). *Enzymatic Assay of PAPAIn*. Recuperado de: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Enzyme_Assay/p4762enz.pdf (junio, 2016).
86. Siklos, M., BenAissa, M. y Thatcher, G. (2015). Cysteine proteases as therapeutic targets: does selectivity matter? A systemic review of calpain and cathepsin inhibitors. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5 (6), 506–519. doi:10.1016/j.apsb.2015.08.001.
87. Silva, C. y García J. (2006). *Laboratorio de Bioquímica*. (1ra. Ed.). España: Editorial MAD S.L.
88. Simon, M., László, K., Kotormán, M. y Szajáni, B. (2001). A comparative study of the conformational stabilities of trypsin and α -chymotrypsin. *Acta Biológica Szegediensis*, 45 (5), 43-49.
89. Sinche, M. (2009). Aislamiento, purificación parcial y caracterización cinética de las proteasas presentes en el látex de los frutos de una planta del género *Vasconella*. (Proyecto de titulación previo a la

obtención del título de Ingeniero Agroindustrial). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.

90. Tripathi, G. (2009). *Enzyme biotechnology*. Jaipur, India: ABD Publishers.
91. Tsuge, H., Nishimura, Y., Tada, Asao, T. y Turk, D. (1999). Inhibition mechanism of cathepsin L-specific inhibitors based on the crystal structure of papain-CLIK148 complex. *Biochemical and Biophysical Research Comm*, 266, 411-416. doi: 10.1006/bbrc.1999.1830.
92. Turk, B. (2006). Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nature Publishing Group* 5, 785-799. doi: 10.1038/nrd2092.
93. Turková, J. (1993). *Bioaffinity Chromatography*. (1ra. Ed.). Amsterdam, Países Bajos: Elsevier Science Publishers. Recuperado de: <https://books.google.com.ec/books?id=heFRJ5CuKScC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false> (Junio, 2016)
94. Van Zuilechen, D. y Van der Poel, A. (1989). Effect of HTST treatment of *Pisum sativum* on the inactivation of antinutritional factors. En: Huisman, J., Van der Poel, A. y Liener, I. (Ed.). *Proceedings of the first International Workshop on Antinutritional Factors (ANF) in Legume Seeds, Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds* (pp. 263–267). Holanda: Wageningen.
95. Villegas, W., Acereto, P. y Vargas, M. (2006). *Análisis Ultravioleta Visible*. (1ra. Ed.). México: Universidad Autónoma de Yucatán.
96. White, C., Campbel, D. y McDowel, L. (2000). Effects of dry matter content on trypsin inhibitors and urease activity in heat treated soybeans fed to weaned piglets. *Animal Feed Science and Technology*, 87 (1-2), 105–115. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0377-8401\(00\)00168-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0377-8401(00)00168-1)
97. Voet, J. y Voet, D. (2006). *Fundamentos de Bioquímica*. (3ra. Ed.). Uruguay: Editorial Médica Panamericana

98. Wingfield, P. (1998). *Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate*. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4817497/> (Diciembre, 2016).
99. Wu, J. y Haard, N. (2000). Purification and characterization of a cystatin from leaves of methyl jasmonate treated tomato plants. *Comparative and Biochemistry and Phisiology*, 127 (2), 209-220. doi: 10.1016/S0742-8413(00)00145-6
100. Xian, M., Chen, X., Liu, Z., Wang, K. y Wang, P. (2000). Inhibition of Papain by S-Nitrosothiols. *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (27), 20467-20473. doi: 10.1074/jbc.M001054200
101. Zhao, Y., Botella, M., Subramanian, L., Niu, X., Nielsen, S., Bressan, R. y Hasegawa, P. (1996). Two wound-inducible soybean cysteine proteinase inhibitors have greater insect digestive proteinase inhibitory activities than a constitutive homolog. *Plant Physiology*, 452 (111), 1299–1306. Recuperado de: <http://www.jstor.org/stable/4277285> (Enero, 2017).

ANEXOS

ANEXO I

DIAGRAMAS DE FLUJO DE PROCESOS

AI.1 Diagrama de activación y oxidación de la matriz sepharosa 6B-Cl

La Figura AI.1 muestra el diagrama del proceso de activación y oxidación para 15 g de soporte de inmovilización.

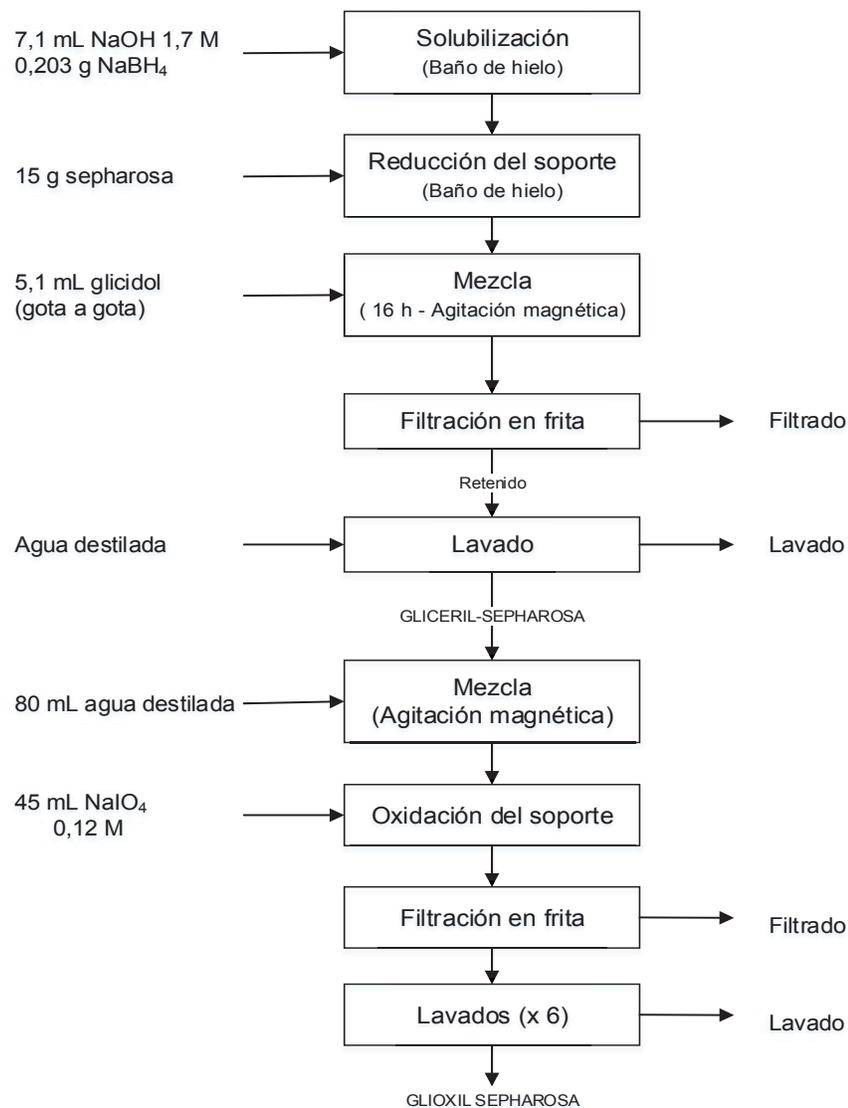


Figura AI.1 Esquema del proceso de activación y oxidación de sepharosa 6B-CL

AI.2 Diagrama del proceso de desengrasado de harina de semillas

El diagrama de la Figura AI.2 resume el proceso de desengrasado de semillas con 1-propanol como solvente.

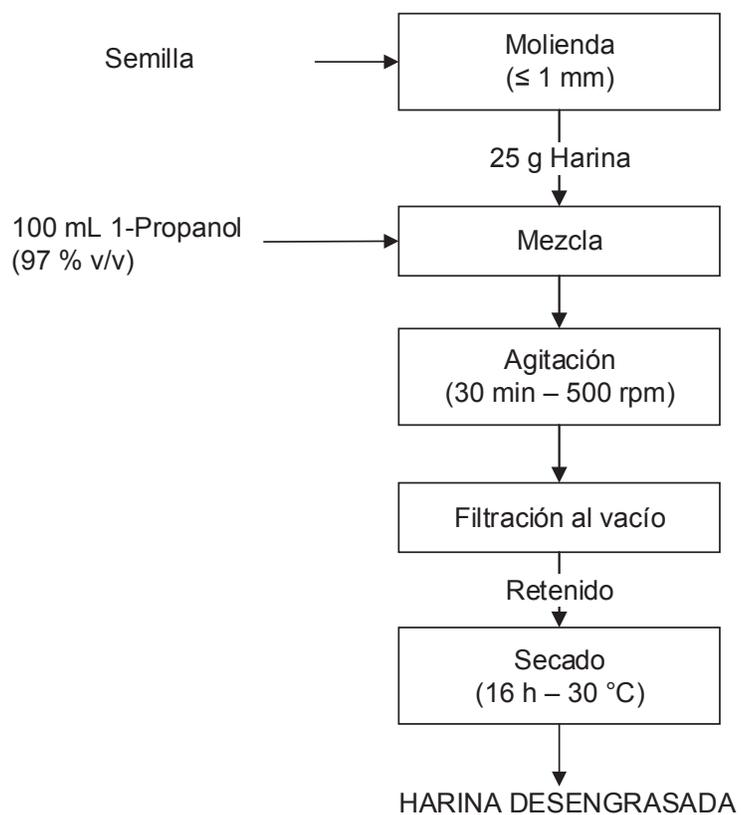


Figura AI.2 Esquema del proceso de desengrasado de harinas

AI.3 Diagrama del proceso de obtención de extractos acuosos

El proceso de obtención de extractos acuosos se resume en el esquema de la Figura AI.3.

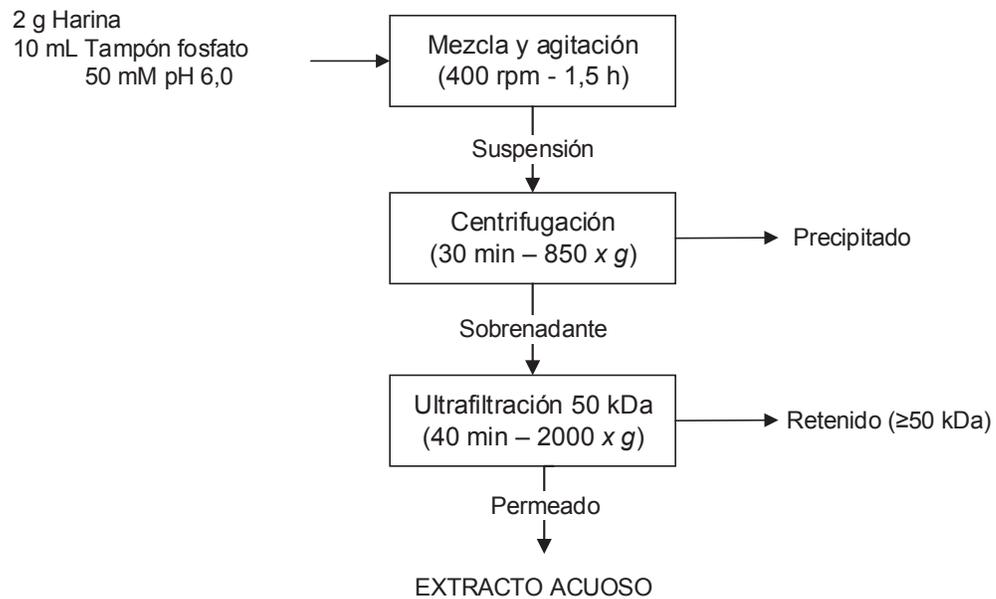


Figura AI.3 Esquema del proceso de obtención de los extractos acuosos de las semillas

ANEXO II

DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ENZIMA INMOVILIZADA, DEL PORCENTAJE DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA INMOVILIZADA, DEL PORCENTAJE DE RETENCIÓN DE ACTIVIDAD FUNCIONAL Y DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ESPECÍFICA

A continuación, se muestra el ejemplo de cálculo de las diferentes variables de respuestas con los datos experimentales de la inmovilización de papaína a pH 8.

AII.1 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ENZIMA INMOVILIZADA (% EI)

El porcentaje de enzima inmovilizada en el soporte se determinó con la ecuación [A.1] establecida por Biasuatti et al. (2006, p. 428).

$$\% \text{ EI} = \frac{m_{\text{Papaína inicial}} - m_{\text{Papaína F+L}}}{m_{\text{Papaína inicial}}} \quad [\text{A.1}]$$

Donde:

$m_{\text{papaína inicial}}$: cantidad de papaína presente en la solución proteica, en mg

$m_{\text{papaína F+L}}$: cantidad de papaína presente en el filtrado y lavados, en mg

Para determinar la cantidad de papaína inicial se empleó la ecuación [A.2].

$$m_{\text{Papaína inicial}} = CE \times V_{\text{Sepharosa}} \quad [\text{A.2}]$$

Donde

$m_{\text{papaína inicial}}$: cantidad de papaína presente en la solución proteica, en mg

CE: concentración de la carga enzimática inicial, en mg/mL

$V_{\text{Sepharosa}}$: cantidad de glioxil-sepharosa, en mL

Entonces, la cantidad de papaína inicial será:

$$m_{\text{Papaína inicial}} = 12 \frac{\text{mg}}{\text{mL sepharosa}} \times 15 \text{ mL sepharosa}$$

$$m_{\text{Papaína inicial}} = 180 \text{ mg}$$

Para determinar la concentración de proteína en el lavado y filtrados se partió de la absorbancia a 280 nm y el coeficiente de extinción de papaína $0,42 \text{ (mg/mL)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Pace, Vajdos, Fee, Grimsley y Gray, 1995, p. 240) con la ecuación [A.3]:

$$[\text{P}] = \frac{DO_{280}}{\varepsilon \times L} \times \frac{1}{f} \quad [\text{A.3}]$$

Donde:

[P]: concentración de proteína, en mg/mL

DO_{280} : densidad óptica a 280 nm

f: factor de dilución

L: longitud que atraviesa la luz en la celda (1 cm)

ε : coeficiente de extinción de la muestra a 280 nm, en $(\text{mg/mL})^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Por lo tanto, la concentración de proteína es la siguiente:

$$[P] = \frac{1,118}{0,42 \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)^{-1} \text{cm}^{-1} \times 1 \text{ cm}} \times \frac{1}{1} \quad \rightarrow \quad [P] = 2,662 \text{ mg/mL}$$

Finalmente, con la concentración conocida y el volumen de cada fracción, se determinó la masa de papaína en mg.

$$m_{\text{Papaína filtrado}} = 2,662 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times 26 \text{ mL}$$

$$m_{\text{Papaína filtrado}} = 69,21 \text{ mg}$$

En la Tabla AII.1 se muestran las cantidades en el filtrado y lavados de papaína-glioxil-sepharosa 6B-CL.

Tabla AII.1 Masa de papaína en el filtrado y lavados de papaína-glioxil-sepharosa 6B-CL

Fracción	DO ₂₈₀	V (mL)	Papaína (mg)
Filtrado	1,118	26	69,21
Lavado 1 - Acetato	0,500	18	21,43
Lavado 1 - Tris-HCl	0,100	15	3,57
Lavado 2 - Acetato	0,009	15	0,32
Lavado 2 - Tris-HCl	0,000	15	0,00
Lavado 3 - Acetato	0,000	15	0,00
Lavado 3 - Tris-HCl	0,000	15	0,00
Lavado 1 - Borato	0,000	15	0,00
Lavado 2 - Borato	0,000	15	0,00
Lavado 1 - Acetato (pH = 5,5)	0,000	15	0,00
TOTAL			94,53

Con base en la ecuación [A.1] se determinó el porcentaje de enzima inmovilizada.

$$\% EI = \frac{180,00 \text{ mg} - 94,53 \text{ mg}}{180,00 \text{ mg}} \times 100 = 47,48 \%$$

AII.2 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA INMOVILIZADA (% AEI)

La actividad enzimática se calculó con la ecuación [1.1] y para el porcentaje de actividad enzimática inmovilizada se empleó la ecuación [A.4].

$$\% AEI = \frac{AE_{\text{inicial}} \times V_{\text{inicial}} - AE_{F+L} \times V_{F+L}}{AE_{\text{inicial}} \times V_{\text{inicial}}} \times 100 \quad [A.4]$$

Donde:

AE_{inicial} : actividad proteolítica de la solución inicial, en U/mL solución proteica

$AE_{F/L}$: actividad proteolítica del filtrado y lavados, en U/mL filtrado o lavado

V_{SP} : volumen de la solución proteica inicial, en mL

$AE_{F/L}$: volumen del filtrado o lavados, en mL

La mezcla de reacción se preparó en una celda de cuarzo con 2 000 μL de tampón acetato 0,3 M pH 5,5 con 500 μL de filtrado o lavado y 300 μL de BApNA disuelto en dimetil formamida (8 mg/mL). Se tomaron mediciones de absorbancia a 405 nm, cada 15 s, por 3 min (Cutíño et al., 2014, p. 21; Sinche, 2009, p. 48). Para el blanco de la reacción se sustituyeron los 500 μL de filtrado o lavado por tampón acetato y se efectuó la misma reacción. El tampón utilizado en los ensayos enzimáticos es tampón acetato de sodio 0,3 M pH 5,5 con EDTA 50 mM y L-cisteína 20 mM, como activadores estabilizantes (Sigma Aldrich, 2013).

La Tabla AII.2 contiene los datos de la variación de DO_{405} en función del tiempo para diferentes fracciones. Se presenta en la Figura AII.1 esta relación gráfica para la papaína soluble y en la Figura AII.2 para el filtrado y lavados.

Tabla AII.2 Densidad óptica a 405 nm en función del tiempo para diferentes fracciones

Tiempo (s)	DO_{405}				
	Papaína soluble	Filtrado	L1 Acetato	L1 Tris HCl	L2 Acetato
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
15	0,013	0,001	0,001	0,000	0,000
30	0,022	0,001	0,002	0,001	0,000
45	0,033	0,002	0,002	0,002	0,001
60	0,042	0,003	0,003	0,002	0,001
75	0,053	0,004	0,004	0,003	0,001
90	0,063	0,005	0,004	0,004	0,002
105	0,073	0,006	0,005	0,004	0,002
120	0,083	0,007	0,006	0,005	0,003
135	0,093	0,008	0,007	0,005	0,003
150	0,103	0,009	0,008	0,005	0,003
165	0,113	0,010	0,008	0,006	0,004
180	0,123	0,011	0,009	0,007	0,004

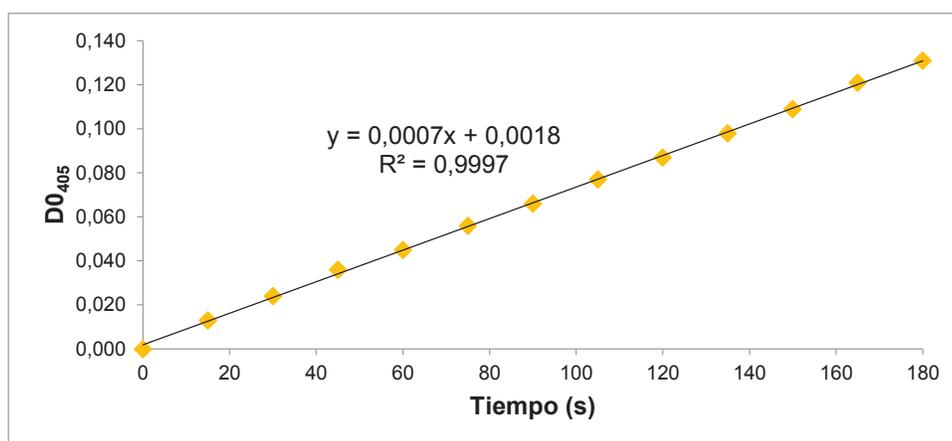


Figura AII.1 Variación de la densidad óptica a 405 nm en función del tiempo para la papaína soluble.

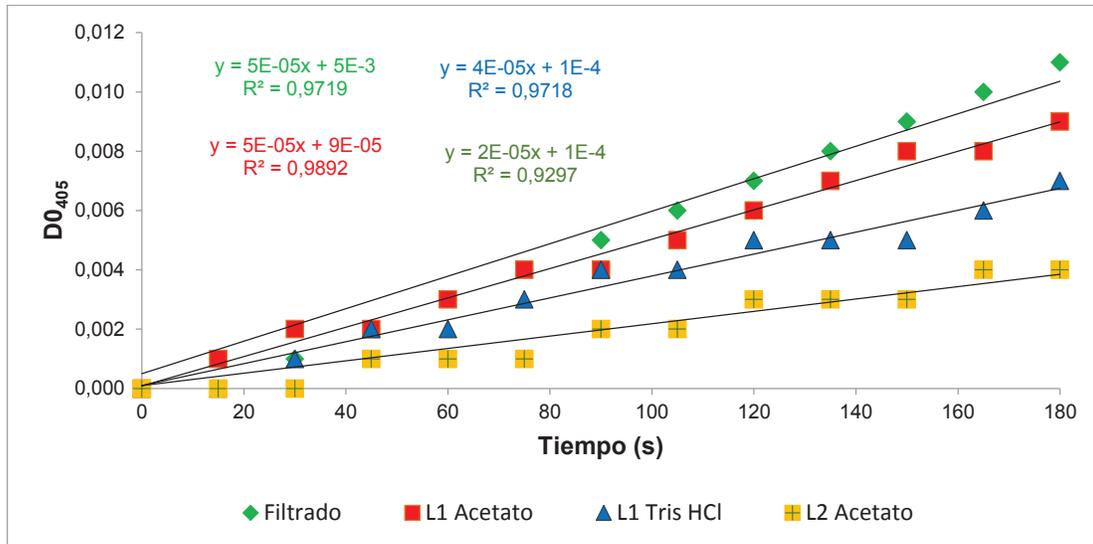


Figura AII.2 Variación de la densidad óptica a 405 nm en función del tiempo para el filtrado, lavado 1 con acetato, lavado 1 con tris-HCl y lavado 2 con acetato

Finalmente, se calcula la actividad enzimática de las diferentes fracciones.

- *Actividad enzimática de la papaína soluble*

$$AE = 7,00 \times 10^{-4} \times \frac{1\,000 \times 2\,800}{8\,800 \times 1 \times 500} = 4,45 \times 10^{-4} \text{ U/mL}$$

- *Actividad enzimática del filtrado*

$$AE = 6,00 \times 10^{-5} \times \frac{1\,000 \times 2\,800}{8\,800 \times 1 \times 500} = 3,82 \times 10^{-5} \text{ U/mL}$$

- *Actividad enzimática del lavado 1 con acetato*

$$AE = 5,00 \times 10^{-5} \times \frac{1\,000 \times 2\,800}{8\,800 \times 1 \times 500} = 3,18 \times 10^{-5} \text{ U/mL}$$

- *Actividad enzimática del lavado 1 con tris-HCl*

$$AE = 4,00 \times 10^{-5} \times \frac{1\,000 \times 2\,800}{8\,800 \times 1 \times 500} = 2,55 \times 10^{-5} \text{ U/mL}$$

- *Actividad enzimática del lavado 2 con acetato*

$$AE = 2,00 \times 10^{-5} \times \frac{1\,000 \times 2\,800}{8\,800 \times 1 \times 500} = 1,27 \times 10^{-5} \text{ U/mL}$$

Tras reemplazar los valores obtenidos en la ecuación [A.4] se determinó el % AEI.

$$\% \text{ AEI} = \frac{(4,45 \times 10^{-4} \times 23,7) - \left[(3,82 \times 10^{-5} \times 26) + (3,18 \times 10^{-5} \times 18) + (2,55 \times 10^{-5} \times 15) + (1,27 \times 10^{-5} \times 15) \right]}{4,45 \times 10^{-4} \times 23,7} \times 100$$

$$\% \text{ AEI} = 79,75$$

AII.3 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RETENCIÓN DE ACTIVIDAD FUNCIONAL (% RAF)

Se determinó el porcentaje de retención de actividad funcional (% RAF) con la ecuación [A.5] propuesta por Li, Gao, Wei, Qu, Ma y Zhou, e igual a la relación de la actividad proteolítica del preparado inmovilizado sobre la actividad proteolítica de la solución enzimática inicial (2010, p. 183).

$$\% \text{ RAF} = \frac{AE_{\text{Directa}} \times V_{PI}}{AE_{\text{Inicial}} \times V_{SE}} \times 100 \quad [\text{A.5}]$$

Para la ecuación [A.5]:

$AE_{directa}$: actividad proteolítica del preparado inmovilizado, en U/mL _{preparado inmovilizado}

$AE_{inicial}$: actividad proteolítica de la solución enzimática inicial, en U/mL _{solución inicial}

V_{PI} : volumen del preparado inmovilizado, en mL.

AE_{SE} : volumen de la solución enzimática inicial, en mL.

La $AE_{inicial}$ se determinó según la ecuación [1.1]. Para determinar la actividad proteolítica directa se realizó la mezcla de reacción con 10 mL de tampón de activación, 1 mL de la matriz inmovilizada y 1 mL de BApNA en DMF (8 mg/mL).

La reacción duró 6 min y se tomó una alícuota cada 1 min, se midió la densidad óptica de la muestra a 405 nm. Se calculó según la ecuación [1.1] y con el factor de corrección del tiempo, como se observa a continuación.

$$AE_{directa} = \frac{DO_{405}}{\Delta t} \times \frac{1\ 000 \times V_c}{\epsilon_n \times L \times V_E} \times \frac{f}{60}$$

$$AE_{directa} = 1,44 \times 10^{-2} \times \frac{1\ 000 \times 12}{8\ 800 \times 1 \times 1} \times \frac{1}{60}$$

$$AE_{directa} = 3,27 \times 10^{-4} \text{ U/mL}$$

Para determinar el % RAF se reemplazaron los valores obtenidos en [A.5]:

$$\% \text{ RAF} = \frac{3,27 \times 10^{-4} \frac{\text{U}}{\text{mL}} \times 13 \text{ mL}}{4,45 \times 10^{-4} \frac{\text{U}}{\text{mL}} \times 23,7 \text{ mL}} \times 100 = 40,30 \%$$

AII.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ESPECÍFICA (AEE)

El cálculo de la actividad enzimática específica (AEE) se realizó con base en la ecuación [A.6] (Cutíño et al., 2014, p. 21).

$$AEE = \frac{AE_{directa}}{m_{\text{Papaína inicial}}} \quad [A.6]$$

Donde:

$AE_{directa}$: actividad proteolítica del preparado inmovilizado, en U/mL_{gel}

$m_{\text{papaína inicial}}$: cantidad de papaína presente en la solución proteica, en mg/mL_{gel}

Los datos antes calculados se reemplazaron en la ecuación [A.6] para determinar el valor de la AEE.

$$AEE = \frac{3,27 \times 10^{-4} \text{ U/mL}_{\text{gel}}}{180 \text{ mg/mL}_{\text{gel}}} = 3,05 \times 10^{-2} \text{ mU/mg}_{\text{Papaína}}$$

ANEXO III

EJEMPLO DE CÁLCULO DE LA ACTIVIDAD DE PAPAÍNA, ACTIVIDAD INHIBIDORA, ACTIVIDAD INHIBIDORA ESPECÍFICA Y GRADO DE PURIFICACIÓN

Se presenta un ejemplo de cálculo de para la caracterización del extracto de amaranto.

AIII.1 ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE LA PAPAÍNA

La actividad enzimática se calculó con la ecuación [1.1]. La mezcla de reacción se preparó en una celda de cuarzo con 2 000 μL de tampón fosfato 50 mM pH 6 con 200 μL de papaína en tampón de activación (EDTA 50 mM y L-cistina 20 mM) y 200 μL de p-NPA disuelto en acetonitrilo (8 mg/mL). Se tomaron mediciones de absorbancia a 348 nm, cada 15 s, por 3 min.

Se graficaron las medidas de absorbancia en función del tiempo, según lo explicado en la sección All.2, se linealizó la curva y se tomó el valor de la pendiente para los cálculos correspondientes.

$$AE = \frac{DO}{\Delta t} \times \frac{1\,000 \times V_c}{\epsilon_n \times L \times V_e} \quad [1.1]$$

$$AE = 0,0017 \times \frac{1\,000 \times 2400}{5150 \times 1 \times 200}$$

$$AE = 0,003961 \frac{\text{U}}{\text{mL}} = 3,961 \frac{\text{mU}}{\text{mL}}$$

AIII.2 ACTIVIDAD INHIBIDORA (AI)

Para la actividad inhibidora se sustituyeron los 600 μL del tampón fosfato por el extracto con inhibidor y se efectuó la misma reacción descrita en la sección AIII.1. La actividad inhibidora se define como la diferencia entre la actividad proteolítica de la papaína con inhibidor y sin inhibidor, según la ecuación A.7 (Muñoz, 2011, p. 27).

$$AE_{\text{sin inhibidor}} = 3,961 \text{ mU/mL}$$

$$AE_{\text{con inhibidor}} = 2,796 \text{ mU/mL}$$

$$AI = (AE_{\text{sin inhibidor}} - AE_{\text{con inhibidor}}) \times \frac{V_{\text{sol.enzimática}}}{V_{\text{sol.inhibidor}}} \quad [\text{A.7}]$$

$$AI = 1,165 \frac{\text{mU}}{\text{mL Solución enzimática}} \times \frac{0,20 \text{ mL sol. enzimática}}{0,60 \text{ mL sol. inhibidora}}$$

$$AI = 0,388 \frac{\text{mU}}{\text{mL sol. inhibidora}}$$

AIII.3 ACTIVIDAD INHIBIDORA ESPECÍFICA (AIE)

La actividad inhibidora específica es la relación de la actividad inhibidora y la concentración de proteína presente en la solución inhibidora. La concentración proteica se calculó según se indica en el apartado AII.1. Se consideró el valor de $1 \text{ (mg/mL)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el coeficiente de extinción a 280 nm.

$$AIE = \frac{AI}{[P]}$$

$$AIE = \frac{0,388 \text{ mU/mL}_{\text{sol.inhibidora}}}{5,280 \text{ mg/mL}_{\text{sol.inhibidora}}} = 0,221 \text{ mU/mg}$$

AIII.4 GRADO DE PURIFICACIÓN (GP)

El grado de purificación se calculó como el coeficiente de la actividad inhibidora específica antes y después de la etapa de purificación, como indica la siguiente ecuación [A.8]:

$$GP = \frac{AIE_{\text{Después de la purificación}}}{AIE_{\text{Inicial}}} \quad [A.8]$$

$$GP = \frac{0,297 \text{ mU/mg}}{0,221 \text{ mU/mg}} = 1,34 \text{ veces}$$

ANEXO IV

MEDICIONES EN LA PURIFICACIÓN DE LAS FRACCIONES MÁS ACTIVAS DE PAPAÍNA POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

En la Tabla AIV.1 se presentan los resultados de las mediciones de la concentración de proteína, actividad inhibidora, actividad inhibidora específica y grado de purificación de las fracciones purificadas de fréjol, mediante cromatografía de afinidad. Se presentan las fracciones recolectadas después de la elución ácida. Las fracciones con concentración de proteína igual a cero han sido omitidas.

Tabla AIV.1 Concentración de proteína, actividad inhibidora, actividad inhibidora específica y grado de purificación, de las fracciones recolectadas en la cromatografía de afinidad del extracto de fréjol

Fracción	[P]	AI	AIE	GP
	mg/mL	mU/mL	mU/mg	Veces
7	0,005	0,000	0,000	0
8	0,011	0,000	0,000	0
9	0,010	0,000	0,000	0
10	0,020	0,000	0,000	0
11	0,032	1,165	36,408	94
12	0,156	0,699	4,481	12
13	0,042	0,699	16,644	43
14	0,035	0,932	26,630	69
15	0,106	1,864	17,586	45
16	0,087	3,262	37,496	97
17	0,070	3,319	47,416	122
18	0,083	3,362	40,508	104
19	0,137	3,495	25,512	66
20	0,093	3,262	35,077	90
21	0,037	1,631	44,083	114
22	0,016	0,233	14,563	38
23	0,016	3,728	233,000	601

De igual forma, se midieron la concentración de proteína, actividad inhibidora y actividad inhibidora específica y se determinó el grado de purificación de las fracciones del extracto de amaranto, mediante cromatografía de afinidad. En la Tabla AIV.2 se presentan los resultados de estas variables para las fracciones con concentración de proteína diferente a cero obtenidas después de la elución ácida.

Tabla AIV.2 Concentración de proteína, actividad inhibidora, actividad inhibidora específica y grado de purificación, de las fracciones recolectadas en la cromatografía de afinidad del extracto de amaranto

Fracción	[P]	AI	AIE	GP
	mg/mL	mU/mL	mU/mg	Veces
5	0,007	0,000	0,000	0
6	0,011	0,000	0,000	0
7	0,016	0,233	14,563	19
8	0,031	0,250	0,000	0
9	0,033	0,466	14,122	18
10	0,034	0,533	6,853	9
11	0,035	1,631	46,602	61
12	0,036	1,750	32,362	42
13	0,042	1,931	38,835	51
14	0,058	2,563	44,191	58
15	0,106	1,864	17,586	23
16	0,021	2,796	133,148	174
17	0,013	2,796	215,086	280
18	0,007	2,796	399,445	521
19	0,029	3,029	104,453	136
20	0,031	2,796	90,197	118
21	0,004	2,796	699,029	911
22	0,002	3,029	1514,563	1 975
23	0,002	2,563	233,010	304
24	0,001	0,000	0,000	0
25	0,000	0,000	0,000	0

ANEXO V

EJEMPLO DE CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS Y DE LA CONSTANTE DE INHIBICIÓN CON LAS FRACCIONES INHIBIDORAS MÁS ACTIVAS DE PAPAÍNA

A continuación, se presenta el ejemplo de cálculo de los parámetros cinéticos (K_m y $V_{máx}$) y de la constante de inhibición para el lote inhibidor I proveniente del extracto de fréjol.

Inicialmente se determinó la actividad proteolítica de papaína en presencia y en ausencia del inhibidor, a diferentes concentraciones; los resultados de estos ensayos se presentan en la Tabla AV.1.

Tabla AV.1 Actividad enzimática de papaína sin inhibidor y en presencia del lote I, a diferentes concentraciones de p-NPA

Concentración de p-NPA		Actividad enzimática (U/mL)	
mg/mL	mM	Papaína	Lote I
3	0,331	$2,86 \times 10^{-3}$	$1,17 \times 10^{-4}$
5	0,552	$4,25 \times 10^{-3}$	$1,75 \times 10^{-3}$
7	0,773	$5,38 \times 10^{-3}$	$2,21 \times 10^{-3}$
9	0,994	$6,31 \times 10^{-3}$	$2,59 \times 10^{-3}$
12	1,325	$7,44 \times 10^{-3}$	$3,06 \times 10^{-3}$

Por el ajuste de los datos al modelo de Michaelis-Menten, se procedió a determinar el valor de K_m y $V_{máx}$ con el método de Lineweaver-Burk. Para lo cual, se graficó el inverso de la actividad enzimática versus el inverso de la concentración de sustrato, como se presenta en la Figura AV.1.

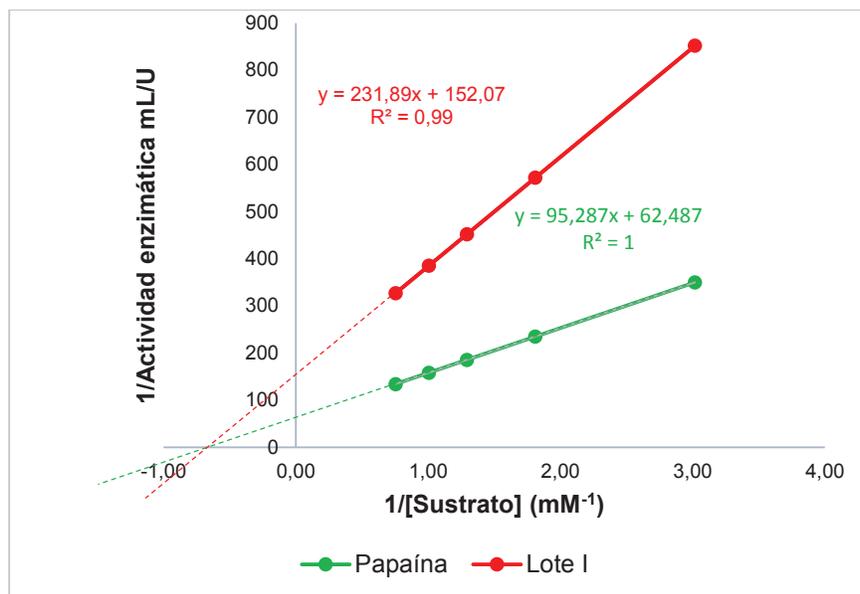


Figura AV.1 Linealización del modelo de Michaelis-Menten mediante el método de Lineweaver-Burk para la papaína sin inhibidor y con el lote I.

Con el punto de corte en el eje de las ordenadas se determinó la velocidad máxima con la ecuación [A.9].

$$b = \frac{1}{V_{\text{máx}}} \quad [\text{A.9}]$$

- *Para la papaína sin inhibidor:*

$$62,487 = \frac{1}{V_{\text{máx}}_{\text{sin inhibidor}}}$$

$$V_{\text{máx}}_{\text{sin inhibidor}} = 1,60 \times 10^{-2}$$

- *Para la papaína en presencia del lote I:*

$$152,07 = \frac{1}{V_{\text{máx}}_{\text{con lote I}}}$$

$$V_{\text{máx con lote I}} = 6,58 \times 10^{-3}$$

La constante Km se determinó con la ecuación [A.10].

$$m = \frac{K_m}{V_{\text{máx}}} \quad [\text{A.10}]$$

- *Para la papaína sin inhibidor:*

$$95,287 = \frac{K_{m \text{ sin inhibidor}}}{1,60 \times 10^{-2}}$$

$$K_{m \text{ sin inhibidor}} = 1,54 \text{ mM}$$

- *Para la papaína en presencia del lote I:*

$$231,89 = \frac{K_{m \text{ con lote I}}}{6,58 \times 10^{-3}}$$

$$K_{m \text{ sin inhibidor}} = 1,53 \text{ mM}$$

En la Tabla AV.1 se muestran los parámetros cinéticos calculados para la papaína en ausencia y en presencia de los lotes inhibidores.

Tabla AV.2 Velocidad máxima ($V_{\text{máx}}$) y constante de Michaelis-Menten (K_m) para la papaína sin inhibidor y con los lotes I, II, III y IV

Papaína		Parámetros cinéticos	
		$V_{\text{máx}}$ (U/mL)	K_m (mM)
Sin Inhibidor		$1,68 \times 10^{-2} \pm 0,01 \times 10^{-2}$	$1,43 \pm 0,11$
Extracto de fréjol	Lote I	$6,52 \times 10^{-3} \pm 0,07 \times 10^{-3}$	$1,59 \pm 0,13$
	Lote II	$1,16 \times 10^{-2} \pm 0,08 \times 10^{-2}$	$1,56 \pm 0,08$
Extracto de amaranto	Lote III	$1,50 \times 10^{-2} \pm 0,06 \times 10^{-2}$	$3,22 \pm 0,11$
	Lote IV	$1,70 \times 10^{-2} \pm 0,06 \times 10^{-2}$	$3,36 \pm 0,08$

De acuerdo con el análisis, se determinó que los lotes I y II son inhibidores no competitivos y los lotes III y IV son inhibidores competitivos.

Sobre este resultado y con referencia en la Tabla 1.1 se calculó el factor α (Nelson y Cox, 2009, p. 210).

- *Para el lote I (Inhibidor no competitivo)*

$$V_{m\acute{a}x_{aparente}} = \frac{V_{m\acute{a}x}}{\alpha}$$

$$\alpha = \frac{V_{m\acute{a}x}}{V_{m\acute{a}x_{aparente}}}$$

$$\alpha = \frac{1,68 \times 10^{-2}}{6,52 \times 10^{-3}} = 2,58$$

- *Para el lote III (Inhibidor competitivo)*

$$K_{m_{aparente}} = \alpha K_m$$

$$\alpha = \frac{K_{m_{aparente}}}{K_m}$$

$$\alpha = \frac{1,59}{1,43}$$

$$\alpha = 1,11$$

Finalmente, con el factor α se determinó la constante de inhibición a través de la ecuación [1.4]

- *Para el inhibidor proveniente de amaranto*

$$\alpha = \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \quad [1.4]$$

$$K_i = \frac{[I]}{\alpha - 1}$$

$$K_i = \frac{9,59 \times 10^{-5}}{1,11 - 1}$$

$$K_i = 8,72 \times 10^{-4} \text{ mM} = 0,872 \text{ } \mu\text{M}$$

- *Para el inhibidor proveniente de fréjol*

$$K_i = \frac{[I]}{\alpha - 1}$$

$$K_i = \frac{9,17 \times 10^{-5}}{2,58 - 1}$$

$$K_i = 5,81 \times 10^{-5} \text{ mM} = 0,058 \text{ } \mu\text{M}$$