



PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Proyecto Interno Proyecto Semilla Proyecto Junior Proyecto Multi e Inter Disciplinario

Investigación Básica Investigación Aplicada Investigación Pedagógica Innovación

DEPARTAMENTO(S):

1. CIENCIAS NUCLEARES

2.

LINEA(S) DE INVESTIGACIÓN:

1. SÍNTESIS ORGÁNICA NO CONVENCIONAL

2.

1 Proyecto de Investigación

Título:

Diseño de un sistema de purificación basado en la afinidad de inhibidores de papaína, quimotripsina o carboxipeptidasa A, provenientes de semillas de amaranto, arveja, chocho, fréjol, quinua o sangorache

Resumen del proyecto (máximo 200 palabras)

Los inhibidores proteolíticos de plantas (IPP) se utilizan en aplicaciones farmacológicas y biotecnológicas por su capacidad de regular proteasas que participan en el proceso patogénico de enfermedades como malaria, hipertensión, artritis, pancreatitis, distrofia muscular, cáncer y SIDA, entre otras. En las semillas de leguminosas y gramíneas abundan los IPP. La presente investigación tiene por objetivo diseñar un sistema mejorado de purificación por afinidad de inhibidores de papaína, quimotripsina o carboxipeptidasa A, provenientes de semillas de amaranto, arveja, chocho, fréjol, quinua o sangorache. Para esto, en primer lugar, se estudiará la síntesis de las matrices de afinidad mediante la inmovilización covalente de cada enzima en sepharosa, con el ajuste del pH de inmovilización y del proceso de reducción del producto inmovilizado con NaBH_4 , para maximizar el porcentaje de enzima y de actividad enzimática inmovilizadas. Finalmente, se establecerá un sistema de purificación de los IPP presentes en la harina desengrasada de las semillas mencionadas, que incluya etapas de ultracentrifugación, tratamiento térmico, insolubilización selectiva y cromatografía de afinidad de los extractos acuosos obtenidos. Con la determinación de la actividad inhibidora de cada extracto sobre papaína, quimotripsina o carboxipeptidasa A, se seleccionarán los inhibidores más activos para caracterizarlos cinética y molecularmente.

Palabras clave (4-6):

Obtención de inhibidores proteolíticos de plantas, inmovilización de proteasas, cromatografía de afinidad, quimotripsina, papaína, carboxipeptidasa A



ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL
VICERECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y PROYECCIÓN SOCIAL

2 Datos personales y académicos del Director del Proyecto		
Apellidos: Castillo Domínguez	Teléfono casa: 6034890	
Nombres: Juan Patricio	Teléfono celular: 0987002825	
Cédula de Identidad: 1705122172		
Cargo actual en la EPN: Profesor T/C de la FIQA		
Dirección particular: Conjunto Puertas de Alcalá, Calle Medardo Silva Oe5-103 y Línea Férrea, San Juan de Cumbayá	Teléfono oficina: 2507144 Ext. EPN: 2446 Correo electrónico: patricio.castillo@epn.edu.ec	
Formación de pregrado y posgrado		
Títulos	Fecha	Institución / Universidad/País
Ingeniero Químico	22-12-1983	Escuela Politécnica Nacional / Ecuador
Maestría en Química Orgánica	22-03-1999	Universidad de La Habana/ Cuba
Doctor en Ciencias de cuarto nivel (PhD)	31-07-2003	Escuela Politécnica Nacional/ Ecuador

3 Datos personales y académicos del Profesor colaborador		
Apellidos: Sinche Serra	Teléfono casa: 2408415	
Nombres: Marco Vinicio	Teléfono celular: 0995778114	
Lugar y fecha de nacimiento: Quito, 2 de junio, 1984		
Cargo actual en la EPN: Docente del Departamento de Ciencias Nucleares		
Dirección particular: Estocolmo E 2-54 y Av. Amazonas	Teléfono oficina: 2976300 Ext. EPN: 4204 Correo electrónico: marco.sinche@epn.edu.ec	
Formación de pregrado y posgrado		
Títulos	Fecha	Institución / Universidad
Ingeniero Agroindustrial	15 - 06 - 2009	Escuela Politécnica Nacional / Ecuador
M.Sc. en Agronomía	22 - 08 - 2013	University of Florida / Estados Unidos de América

4 Datos personales del personal administrativo de investigación (opcional)		
Apellidos:	Teléfono casa:	
Nombres:		
Lugar y fecha de nacimiento:		
Cargo actual en la EPN:	Teléfono celular:	
Dirección particular:	Teléfono oficina: Ext. EPN: Correo electrónico:	
Formación de pregrado y posgrado		
Títulos	Fecha	Institución / Universidad



5 Objetivos, relevancia, productos y resultados esperados de esta propuesta de investigación

5.1 Objetivos

5.1.1 Objetivo General

Diseñar un sistema de purificación basado en la afinidad de los inhibidores de papaína, quimotripsina o carboxipeptidasa A, provenientes de semillas de amaranto, arveja, chocho, fréjol, quinua o sangorache.

5.1.2 Objetivos Específicos

- a) Mejorar el porcentaje de enzima y de actividad enzimática inmovilizadas en las matrices de afinidad obtenidas mediante enlace covalente de cada enzima con sepharosa, a través del ajuste del pH de inmovilización y del proceso de reducción del producto inmovilizado con NaBH_4 .
- b) Seleccionar el mejor sistema de purificación de extractos acuosos de semillas de amaranto, arveja, chocho, fréjol, quinua o sangorache, con actividad inhibidora de papaína, quimotripsina o carboxipeptidasa A.
- c) Caracterizar molecular y cinéticamente las fracciones inhibidoras purificadas que presenten la mayor actividad inhibidora específica sobre cada proteasa.

5.2 Relevancia de esta propuesta de investigación y su relación con la(s) Línea(s) de investigación asociadas

La evolución ha dotado a las plantas de mecanismos de protección natural que dependen de la presencia de proteínas, que constituyen sustancias tóxicas o antimetabólicas para las plagas. Entre estas moléculas se encuentran inhibidores enzimáticos, inactivadores de ribosomas, enzimas, lectinas etc., cuya principal función es crear una barrera protectora (Dunaevsky, Elpidina, Vinokurov y Belozersky, 2004, p. 608).

Los IPP son proteínas de bajo peso molecular, entre 6 y 25 kDa, que interactúan con las enzimas para limitar su actividad catalítica. Se encuentran presentes en los tejidos vegetales y son específicos para cada tipo de proteasa (Mosolov y Valueva, 2004, p. 1307). Se encuentran en mayor abundancia en semillas en etapa de germinación (Habib y Majid, 2007, p. 70). Se destacan aquellas que inhiben enzimas digestivas del grupo serino proteasas (Goyoaga, 2005, p. 49).

Gracias a la capacidad de inactivar enzimas proteolíticas diana de procesos patogénicos, la química fina se enfoca en el estudio de inhibidores de proteasas para el desarrollo de nuevos fármacos (Robert, 2005), que permitan el control de enfermedades como malaria, hipertensión arterial, enfisema, artritis, pancreatitis, trombosis, distrofia muscular, cáncer, SIDA, etc. (Johnson y Pellecchia, 2006, p. 317). Por otra parte, los IPP también se utilizan en la agricultura como una técnica de control biológico de plagas de insectos pues interfieren en su digestión (Ryan, 1990, p.426; Ahn, Salzman, Braunagel, Koiwa y Zhu-Salzman, 2004, p.649).

Los antecedentes señalados indican el crecimiento de la demanda de extracción y purificación de inhibidores enzimáticos. Según Voet y Voet (2006) la purificación de proteínas depende del fin que tendrá posteriormente, por ejemplo, para desarrollar proyectos de investigación o para usos terapéuticos es necesario tener biomoléculas altamente purificadas (p. 136) mediante procesos que no alteren la actividad biológica de las mismas (Álvarez, 2005, p. 4).

Una técnica de purificación muy empleada para estos fines es la cromatografía de afinidad, que aprovecha la capacidad de las proteínas para adherirse selectiva y reversiblemente a otras moléculas (Voet y Voet, 2006, p. 148) o ligandos que se encuentran inmovilizadas sobre una matriz sólida que llena una columna (Turková, 1993, p. 9).

Trabajos de investigación desarrollados anteriormente en el Laboratorio de Investigaciones Aplicadas del Departamento de Ciencias Nucleares, en la línea de investigación de Síntesis no Convencional, sublínea de Química Fina, realizaron la purificación de inhibidores de proteasas por cromatografía de afinidad con un ligando de tripsina-glioxil-sepharosa. El proyecto propuesto pretende mejorar el proceso de purificación con la utilización de quimotripsina, papaína o carboxipeptidasa A inmovilizadas independientemente en matrices de manera para alcanzar un mayor grado de pureza de los inhibidores. Este proyecto contribuirá al desarrollo de nuevas áreas de investigación en química fina y biotecnología.



5.3 Productos esperados

- a. Publicaciones científicas (obligatorio);
- b. Disertación a la Comunidad Politécnica;
- c. Proyecto de Titulación;
- d. Tesis de Grado (maestría o doctorado);
- e. Aplicación tecnológica construida o implementada;
- f. Patente presentada;
- g. Perfil de proyecto de mayor impacto científico, técnico, pedagógico o de innovación.

5.4 Detalle de los resultados esperados (con relación a los objetivos)

- a) Papaína, quimotripsina o carboxipeptidasa A enlazadas covalentemente a sepharosa, con altos porcentajes de enzima y actividad enzimática inmovilizadas.
- b) Extractos clarificados, purificados y concentrados de inhibidores proteolíticos de papaína, quimotripsina o carboxipeptidasa A presentes en semillas de amaranto, arveja, chocho, fréjol, quinua o sangorache.
- c) Características moleculares y cinéticas de las fracciones de inhibidores purificados que presenten mayor actividad específica sobre cada proteasa.



6	Descripción, metodología y cronograma de trabajo
<p>6.1 Descripción, metodología y diseño del proyecto (Máximo dos carillas)</p> <p>El propósito principal de este proyecto de investigación se relaciona con el diseño de un sistema de purificación que utilice, entre otras etapas, una de cromatografía líquida de afinidad entre papaína, quimotripsina o carboxipeptidasa A enlazadas de manera individual a una matriz de sepharosa y sus correspondientes inhibidores provenientes de semillas certificadas de amaranto, arveja, chocho, fréjol, quinua o sangorache.</p> <p>Para desarrollar este proyecto, inicialmente se acondicionará el soporte de inmovilización para evitar dificultades estéricas o difusionales que disminuyan la actividad enzimática mediante la activación de la sepharosa con glicol y la posterior oxidación de la gliceril-sepharosa formada con NaIO_4 (Bonzón, 1996, p. 35).</p> <p>En la matriz activada se inmovilizarán covalentemente papaína (PA), quimotripsina (QT) o carboxipeptidasa A (CPA), según el método propuesto por Bonzón (1996, p. 36) y modificado por Betancourt (2001, p. 44) y Quinchuela (2013, p. 31-35). Se estudiará el efecto del pH de inmovilización y el proceso de reducción del producto inmovilizado con NaBH_4 pues son factores que permiten, por una parte, disponer de grupos aminos de la enzima convenientemente desprotonados para su enlazamiento covalente con los grupos carbonilos de la matriz y, por otra, transformar los grupos iminas formados hasta grupos aminos inertes, para así maximizar el porcentaje de enzima inmovilizada (%EI) y el porcentaje de actividad enzimática inmovilizada (%AEI) para cada proteasa (Quinchuela, 2013, p. 35-37). La selección del pH se realizará con un diseño experimental unifactorial de cinco niveles, con valores de 9,0; 9,5; 10,0; 10,5 y 11,0. La reducción del producto inmovilizado se llevará a cabo al valor de pH seleccionado en el proceso anterior, con concentraciones de NaBH_4 de 5 mg/mL y 10 mg/mL, añadidas directamente o en solución refrigerada preparada en el mismo tampón de inmovilización.</p> <p>Los inhibidores proteolíticos de plantas se obtendrán a partir de extractos acuosos de harina desengrasada de las semillas de amaranto, arveja, chocho, fréjol, quinua o sangorache, según el método desarrollado por Muñoz (2011, p. 28-29) y modificado por Echeverría (2014, p. 38).</p> <p>Se determinará la concentración proteica de cada extracto a través de espectrometría UV con la medición de la absorbancia a 280 nm. La actividad inhibidora y la actividad inhibidora específica de los extractos frente a quimotripsina, carboxipeptidasa A o papaína se evaluará de manera espectrofotométrica con sustratos específicos como N-Succinil-L-fenilalanina-p-nitroanilida, Hipuril-L-fenilalanina o BApNA, respectivamente, o con caseína, como sustrato genérico, según su disponibilidad (Becker, Makkar y Siddhuraju, 2007, p. 7; Jácome, 2015, p. 47-48; Worthington Biochemical Corporation, 2015).</p> <p>Se estudiará la influencia del volumen de enzima o extracto sobre la actividad inhibidora y la actividad inhibidora específica a través de un diseño experimental 3^2 para cada extracto acuoso donde los factores a controlar serán el volumen de la enzima y el volumen del extracto en rangos que se establecerán en pruebas preliminares, de acuerdo con el método desarrollado por Jácome (2015, p. 48-49).</p> <p>Se seleccionará el sistema de purificación para los mejores inhibidores de cada una de las enzimas mediante la evaluación de la influencia que ejercen, en el grado de purificación global, las etapas de ultracentrifugación con membranas de 10 y 3 kDa, de tratamiento térmico a 60 °C, de insolubilización selectiva con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y de cromatografía de afinidad. Se partirá del resultado logrado con la aplicación de todas las etapas y se eliminarán las que menos aporten al grado de purificación. Siempre se combinarán al menos una etapa de bajo grado de resolución y la de cromatografía de afinidad (Echeverría, 2014, p. 38-45).</p> <p>Finalmente, las fracciones purificadas se caracterizarán cinética y molecularmente con la metodología propuesta por Muñoz (2011, 28-33) y mediante ensayos de electroforesis, para estimar el peso molecular según el método de Laemmli (1970, pp. 680-685), adaptado por Jácome (2015, p. 86). La identificación del tipo de inhibición se realizará con el estudio de las variables cinéticas, es decir, la constante de Michaelis-Menten, velocidad máxima y constante de inhibición (Nelson y Cox, 2009, p. 211).</p>	



6.2 Cronograma de trabajo anual: (Descripción)

Primer Año

Actividad	Porcentaje de avance por meses (%)						TOTAL
	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	
Colecta y preparación del material	50	50					100%
Revisión bibliográfica	25	25	10	10	10	20	100%
Inmovilización de enzimas	30	30	40				100%
Caracterización de las enzimas inmovilizadas obtenidas			50	50			100%
Obtención y caracterización de extractos		25	25	25	25		100%
Purificación parcial de extractos clarificados de inhibidores			40	30	30		100%
Cromatografía de afinidad			25	50	25		100%
Caracterización de inhibidores más activos			30	30	40		100%
Tratamiento de resultados	10	10	20	20	30	10	100%
Informe final				25	25	50	100%

6.3 Referencias bibliográficas:

- Ahn, J., Salzman, R., Braunagel, S., Koiwa, H., y Zhu-Salzman, K. (2004). Functional roles of specific bruchid protease isoforms in adaptation to a soybean protease inhibitor. *Insect Molecular Biology*, 13(1), 649–657.
- Álvarez, C. (2005). *Purificación de Proteínas*. Recuperado de: <http://ufq.unq.edu.ar/Docencia-Virtual/Bioquimica/Teorias/T15-Purificacion.pdf> (Junio, 2015)
- Betancourt, E. (2001). *Estudio del proceso de inmovilización de la enzima aminoacilasa I de riñón porcino (ARP) en sepharosa mediante enlace covalente*. (Tesis de pregrado). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.
- Becker, K., Makkar, M. y Siddhuraju, P. (2007). *Plant Secondary Metabolites*. http://www.beck-shop.de/fachbuch/leseprob/e/9781588299932_Excerpt_001.pdf, p. 7. (Junio, 2015).
- 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*. (Trabajo de diploma). Universidad de la Habana, La Habana, Cuba.
- Dunaevsky, Y., Elpidina, E., Vinokurov, K. y Belozersky, M. (2004). Protease Inhibitors in Improvement of Plant Resistance to Pathogens and Insects. *Molecular Biology*, 39(4), 608-613.
- Echeverría, P. (2014). *Purificación y Caracterización de Inhibidores de Tripsina Provenientes de Semillas de Amaranto, Arveja, Chocho, Fréjol y Sangorache, mediante Cromatografía de Afinidad*. (Tesis de pregrado). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.
- Goyoaga, C. (2005). *Estudio de factores no nutritivos en vicia faba i.: influencia de la germinación sobre su valor nutritivo*. Departamento de Nutrición y Bromatología. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- Habib, M. y Majid, K. (2007). Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology*, 2(3), 68-85.
- Jácome, G. (2015). *Obtención de Extractos Clarificados y Concentrados de Inhibidores de Proteasas a partir de Semillas de Cereales y Leguminosas Seleccionadas*. (Tesis de pregrado). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.



	<ol style="list-style-type: none">11. Johnson, S. y Pellecchia, M. (2006). Structure and fragment based approaches to protease inhibition. <i>Current Topics in Medicinal Chemistry</i>, 6, 317–329.12. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. <i>Nature</i>, 227(5259), 680-68513. Mosolov V. y Valueva T. (2004). Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. <i>Biochemistry (Moscow)</i>, 69(11), 1305-1309.14. Muñoz F. (2011). <i>Aislamiento y Purificación de Inhibidores de Tripsina presentes en Semillas de Leguminosas o Gramíneas Producidas en el Ecuador</i>. (Tesis de pregrado). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.15. Nelson, D. y Cox, M. (2009). <i>Lehninger Principios de Bioquímica</i>. (5ta. Ed.) España: Omega.16. Quinchuela, L. (2013). <i>Inmovilización covalente de la tripsina en Sepharosa</i>. (Tesis de pregrado). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.17. Robert, A. (2005). <i>Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists</i>. Wiley, Germany.18. Ryan, C. (1990). Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. <i>Annual Review of Phytopathology</i>, 28, 425–449.19. Turková, J. (1993). <i>Bioaffinity Chromatography</i>. (1ra. Ed.). Amsterdam, Países Bajos: Elsevier Science Publishers.20. Voet, J. y Voet, D. (2006). <i>Bioquímica</i>. (3ra. Ed.). Uruguay: Editorial Médica Panamericana21. Worthington Biochemical Corporation. (2015). Carboxypeptidase A Assay. Recuperado de: http://www.worthington-biochem.com/COA/assay.html (Junio, 2015)
7	Fechas de inicio y fin
	<i>Inicio</i> 04-Enero-2016
	<i>Fin</i> 30-Diciembre-2016

8	Infraestructura, equipos y fondos adicionales.
	8.1 Infraestructura y equipos <ul style="list-style-type: none">• Laboratorio de Investigaciones Aplicadas - FIQA• Laboratorio de Química Orgánica - FIQA• Agitador magnético• Balanza analítica• Baño maría• Bomba de vacío• Centrifuga• Espectrofotómetro UV-Vis• Equipo de electroforesis• Estufa• Molino• Rota-vapor• Sistema de cromatografía líquida
	8.2 Breve justificación del equipo requerido
	Para la ejecución del proyecto de investigación propuesto no es necesaria la adquisición de equipo nuevo.
	- Justificar la infraestructura y equipos solicitados para la ejecución del proyecto
	La infraestructura y los equipos disponibles en el laboratorio son los apropiados para la manipulación especializada de proteínas de bajo y mediano peso molecular, como las enzimas proteolíticas y los inhibidores de proteasas que se estudiarán.
	8.3 Fondos Adicionales
	Ninguno



ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL
VICERECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y PROYECCIÓN SOCIAL

9 Presupuesto estimado para la ejecución del presente proyecto (anual)		
<u>Primer Año</u>		
Lista de ítems	Cantidad solicitada (US \$)	Porcentaje de Ejecución (%)
1. Contratación Servicios Personales por Contrato <i>Ayudantes de Investigación</i>	3 800,00	
Subtotal	3 800,00	
2. Maquinaria y Equipos		
Subtotal	0,00	
3. Reactivos y materiales de laboratorio		
Quimotripsina de páncreas bovino (4 g)	786,80	
Carboxipeptidasa A (10 kU)	1 138,40	
N-Succinil-L-fenilalanina-p-nitroanilida (5 g)	436,50	
Hipuril-L-Fenilalanina (3 g)	598,00	
Sepharosa (2 L)	2 543,20	
Glicidol (1000 g)	579,60	
BAPNA (1 g)	136,40	
1- Propanol P.A. (1L)	182,00	
2-Mercaptoetanol para síntesis (100 mL)	48,00	
Ácido acético glacial (2L)	35,00	
Ácido bórico P.A. (500 g)	46,00	
Ácido clorhídrico 37% P.A. (2,5 L)	29,00	
Ácido etilenaminotetraacético-EDTA (500g)	180,00	
Acrilamida para síntesis (500 g)	46,00	
Azul brillante de bromofenol (25 g)	411,00	
Azul brillante de Coomassie G-250 (25 g)	168,00	
Bicarbonato de sodio P.A. (2kg)	52,00	
Borohidruro de sodio para síntesis (10 g)	25,00	
Cloruro de calcio di hidratado (1 kg)	40,00	
Glicina P.A. (500 g)	220,00	
Glicerina P.A. (1 L)	140,00	
Hidróxido de sodio en lentejas P.A. (1kg)	17,00	
Metanol P.A. (5 L)	70,00	
Sulfato de amonio P.A. (100 g)	62,00	
Tetrametil etilen diamina TEMED (200 mL)	122,00	
Sodio Di hidrógeno fosfato Monohidrato P.A. (1kg)	52,00	
Subtotal	8 163,90	
4. Literatura especializada		
Subtotal	0,00	
5. Viajes técnicos y de muestreo		
Subtotal	0,00	
6. Presentación de ponencias en congresos internacionales y publicaciones	3 000,00	
Subtotal	3 000,00	
TOTAL PRESUPUESTO	14 963,90 + IVA	



ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL
 Departamento de Ciencias Nucleares
 CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES DEL PROYECTO PIS 15-15



Período:

Año:

Director del Proyecto:

Nº	Actividad	Febrero				Marzo					Abril				Mayo				Junio				Julio				Agosto					Septiembre				Octubre				Noviembre				Diciembre						
		1	2	3	4	1	2	3	4	5	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	5	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4			
1	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2	COLECTA Y PREPARACIÓN DE MATERIALES	X	X	X	X	X	X	X																																										
3	DESENGRASADO DE HARINAS DE SEMILLAS		X	X	X																				X	X	X	X																						
4	INMOVILIZACIÓN DE QUIMOTRIPSINA	X	X	X	X	X	X																																											
5	INMOVILIZACIÓN DE CARBOXIPEPTIDASA																								X	X	X	X	X	X	X	X																		
6	INMOVILIZACIÓN DE PAPAÑA																								X	X	X	X	X	X	X	X	X	X																
7	DEFINIR MEJOR CONDICIÓN DE INMOVILIZACION						X	X	X	X																			X	X	X	X																		
8	CARACTERIZAR ENZIMAS INMOVILIZADAS						X	X	X	X																			X	X	X	X																		
9	OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ACUOSOS											X	X	X	X														X	X	X	X																		
10	CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS											X	X	X	X														X	X	X	X																		
11	PURIFICACIÓN PARCIAL DE EXTRACTOS												X	X	X															X	X	X	X																	
12	CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD														X	X	X	X	X	X	X												X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
13	CARACTERIZACIÓN INHIBIDORES MÁS ACTIVOS																X	X	X	X																			X	X	X	X								
14	TRATAMIENTO DE RESULTADOS														X	X	X	X	X	X	X																X	X	X	X	X	X	X	X						
15	INFORME DE RESULTADOS																		X	X	X	X	X																				X	X	X					


 PATRICIO CASTILLO, PhD
 PROYECTO PIS 15-15

