

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN INTERNOS SIN  
FINANCIAMIENTO O AUTOGESTIONADOS**  
ANEXO 1 - DATOS INFORMATIVOS

Fecha de presentación (dd/mm/aa): 21/05/2019

Título del proyecto: *(Revisar la guía para la presentación de las propuestas de los proyectos de investigación)*  
Estudio de la actividad inhibidora de la enzima Carboxipeptidasa A presente en plantas del cereal andino quinua  
*(Chenopodium quinoa)*

**TIPOS DE INVESTIGACIÓN**

Investigación básica

Investigación aplicada

**DEPARTAMENTO(S) Y/O INSTITUTO(S):**

1. Departamento de Ciencias Nucleares (DCN) ✓
- 2.

**LÍNEA(S) DE INVESTIGACIÓN (verificable en el SAEW):**

1. Síntesis orgánica no convencional ✓
- 2.

**RESUMEN DE INFORMACIÓN DEL DIRECTOR Y COLABORADORES**

| Director                            |               |      |                    |  |
|-------------------------------------|---------------|------|--------------------|--|
| Apellidos y nombres                 | No. de Cédula | HSS  | Departamento       | Título de mayor nivel y mención.                         |
| CASTILLO DOMÍNGUEZ<br>JUAN PATRICIO | 1705122172    | 10 ✓ | Ciencias Nucleares | Doctor en Ciencias (PHD) de cuarto nivel en Biocatálisis |

| Colaborador(es) Internos         |               |     |                    |  |
|----------------------------------|---------------|-----|--------------------|--|
| Apellidos y nombres              | No. de Cédula | HSS | Departamento       | Título de mayor nivel y mención                  |
| SINCHE SERRA MARCO<br>VINICIO    | 1719567826    | 6 ✓ | Ciencias Nucleares | Master of Science (M.Sc) en Ciencias Agronómicas |
| JÁCOME CAMACHO<br>GONZALO RAFAEL | 1720278082    | 4 ✓ | Ciencias Nucleares | Master en Administración de Empresas             |
|                                  |               |     |                    |  |

| Colaborador Externo              |               |     |   |  |
|----------------------------------|---------------|-----|---|--|
| Apellidos y nombres              | No. de Cédula | HSS | Institución   | Título de mayor nivel y mención.                   |
| VELÁSQUEZ CARRERA<br>JOSÉ SERGIO | 1708214026    | 4 ✓ | Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias-INIAP | Master of Science (M.Sc) en Tecnología de Semillas |
|                                  |               |     |   |  |

\* HSS = Horas Semana Semestre



|  |                                  |
|--|----------------------------------|
| <b>1</b>   | <b>Proyecto de Investigación</b> |
| <b>Título:</b><br>Estudio de la actividad inhibidora de la enzima Carboxipeptidasa A presente en plantas del cereal andino quinua ( <i>Chenopodium quinoa</i> Willd)   |                                  |
| <b>Resumen del proyecto</b><br>La quinua ( <i>Chenopodium quinoa</i> Willd) es un cultivo andino autóctono, con un consumo creciente en el mundo por su valor nutritivo. En el Ecuador existe una sobreproducción de quinua; en consecuencia, se busca darle valor agregado con la fabricación de productos terminados, al tiempo que se investiga la presencia de biomoléculas útiles para aplicaciones industriales. Entre ellas se encuentran los inhibidores de proteasas, como los de la Carboxipeptidasa A (CPA). El presente proyecto plantea establecer un protocolo para medir la actividad enzimática de la CPA, con el sustrato cromogénico hipuril-fenilalanina; y, posteriormente emplearlo en la determinación de la actividad inhibidora (AI) de CPA con extractos de diferentes órganos de la planta de quinua. Se comenzará con la siembra, luego de un mes se recolectarán muestras de raíces, tallos y hojas, que se liofilizarán, molerán y se suspenderán en medio acuoso, por separado. Los extractos se ultrafiltrarán y en las fracciones se determinarán la concentración de proteína, la AI y la actividad inhibidora específica (AIE). El extracto con mayor AIE se purificará mediante cromatografía de filtración en gel. En la fracción más activa, se establecerán el peso molecular y las características cinéticas del inhibidor purificado. Paralelamente, luego de 1, 3 y 6 meses de desarrollo, se producirán heridas en varias hojas y, luego de 48 h, se recolectarán muestras para ser analizadas, frente a muestras de hojas control (sin heridas). Se prepararán extractos que serán sometidos al proceso de semipurificación ya indicado y se compararán los resultados alcanzados, para establecer el efecto estimulante de la herida en la producción de AIE frente a CPA. |                                  |
| <b>Palabras clave:</b><br>Inhibidor de Carboxipeptidasa A, cereal andino quinua, purificación de inhibidores.  |                                  |

|          |   |
|----------|---|
| <b>2</b> | <b>Objetivos, relevancia, productos y resultados esperados de esta propuesta de investigación</b> |
|----------|---|

### 2.1 Objetivos

#### 2.1.1 Objetivo General

Caracterizar un inhibidor de la enzima Carboxipeptidasa A, procedente del órgano más activo de la planta del cereal andino quinua (*Chenopodium quinoa* Willd), en la etapa fenológica de seis hojas verdaderas, y evaluar el efecto de una herida mecánica sobre la actividad inhibidora de CPA en hojas.

#### 2.1.2 Objetivos Específicos

- a. Establecer las condiciones de ensayo que permitan medir la actividad enzimática e inhibidora de la enzima carboxipeptidasa A (CPA), con hipuril-fenilalanina como sustrato.
- b. Seleccionar el órgano de la planta de quinua con mayor actividad inhibidora frente a CPA, en la etapa fenológica de seis hojas verdaderas.
- c. Purificar y caracterizar el inhibidor de CPA más activo.
- d. Evaluar el efecto producido por una herida mecánica en hojas de quinua, sobre la actividad inhibidora de CPA, en tres etapas fenológicas del cultivo: 6 hojas verdaderas, panojamiento y madurez fisiológica.

#### 2.2 Detalle de los resultados esperados

- a. Protocolo para la determinación de la actividad enzimática e inhibidora de CPA, con el uso de hipuril fenilalanina, un sustrato cromogénico específico.
- b. Actividad inhibidora frente a CPA en raíces, tallos y hojas de quinua, al mes de sembrada la semilla.
- c. Valores del peso molecular y de IC<sub>50</sub> para el inhibidor purificado más activo frente a CPA.

60





**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN INTERNO SIN  
FINANCIAMIENTO O AUTOGESTIONADOS**  
ANEXO 2 – DETALLES DE LA PROPUESTA

Investigación Básica  Investigación Aplicada

**DEPARTAMENTO(S) Y/O INSTITUTO(S):**  
1. Departamento de Ciencias Nucleares (DCN)  
2.

**LINEA(S) DE INVESTIGACIÓN:**  
1. Síntesis orgánica no convencional  
2.

| <b>DISCIPLINA CIENTÍFICA (Marque X, solamente una opción)</b> |   |
|---|---|
| Ciencias Naturales y Exactas;                                 | X |
| Ingeniería y Tecnologías;                                     |   |
| Ciencias Médicas;   |   |
| Ciencias Agrícolas;   |   |
| Ciencias Sociales;  |   |
| Humanidades   |   |

| <b>OBJETIVO SOCIOECONÓMICO (Marque X, solamente una opción)</b>                                  |   |
|--|---|
| Exploración y explotación del medio terrestre;<br>Ambiente;                                      | X |
| Exploración y Explotación del espacio;   |   |
| Transporte, telecomunicaciones y otras infraestructuras;   |   |
| Energía;   |   |
| Producción y tecnología industrial;  |   |
| Salud;   |   |
| Agricultura;   |   |
| Educación;   |   |
| Cultura, ocio, religión y medios de comunicación;  |   |
| Sistemas políticos y sociales, estructuras y procesos;   |   |
| Defensa;   |   |
| Avance general del conocimiento: I+D financiada con los Fondos Generales de Universidades (FGU); |   |
| Avance general del conocimiento: I+D financiados con otras fuentes.                              |   |

*H. Cantelero*

*ce*



- d. Actividad inhibidora frente a CPA en hojas de plantas con o sin herida mecánica, luego de 1, 3 y 6 meses desde la siembra.

### 2.3 Problema a estudiar

El conocimiento de la distribución y abundancia de inhibidores de proteasas, como el inhibidor de Carboxipeptidasa A (CPA), en la planta de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd), un cultivo autóctono andino con relevancia económica, social y cultural, podría contribuir con la búsqueda de alternativas que proporcionen valor agregado a esta materia prima, en momentos en que su precio decae por niveles de sobreproducción local, y por la necesidad creciente de generar productos como bioinsecticidas, que incrementen el rendimiento en las cosechas. En un futuro, este conocimiento podría permitir la producción de inhibidores de proteasas con el empleo de métodos de crecimiento de tejidos vegetales *in vitro*.

### 2.4 Hipótesis general

Inhibidores proteicos de CPA se expresan sistémicamente en la planta de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd), principalmente en las semillas; su acumulación decae con la edad, aunque la respuesta local persiste a lo largo de la vida de la planta producto de una herida mecánica, que induce al aumento de la actividad inhibidora.

|          |  |
|----------|--|
| <b>3</b> | <b>Relevancia de la propuesta de investigación y su relación con la(s) líneas de investigación</b> |
|----------|--|

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) es un cultivo autóctono andino, conocido desde la época Precolombina, pero muy poco aprovechado <sup>[1]</sup>. Actualmente, su consumo ha crecido por su valor nutritivo. Es una rica fuente de aminoácidos esenciales como lisina, isoleucina, treonina, fenilalanina y valina, tanto en las semillas, como en las hojas, con un contenido de proteína total de 16,7 y 27,8%, respectivamente <sup>[2; 3]</sup>. En la quinua las albúminas y las globulinas constituyen la mayor fracción proteica (del 44 al 77 % de proteína total) y las prolaminas están en menor porcentaje (0,5 a 7,0 %) en la semilla <sup>[4]</sup>.

La quinua posee gran demanda nacional e internacional y relevancia económica, social y cultural. En Ecuador se cultivan más de 1 200 ha, principalmente en Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Chimborazo y Loja <sup>[5]</sup>. En el 2016, se generó un excedente de producto por la pérdida de compradores tales como EUA, Francia y Canadá; y, por el surgimiento de competidores con bajos costos de producción en Perú y Bolivia, lo que motivó la reducción del precio internacional, de 120 USD el quintal a 25 USD <sup>[6]</sup>. El hecho de que el Ecuador se ha convertido en un país productor y exportador marginal de quinua ha despertado el interés local por la apertura de nuevos mercados y por la búsqueda de alternativas que permitan darle valor agregado a la quinua mediante su inclusión como materia prima en la fabricación de harinas, hojuelas, cereales reventados, granolas, barras energéticas, entre otros <sup>[7; 8]</sup>. Para fomentar este cultivo por parte de pequeños y grandes productores, se deben buscar opciones innovadoras que generen adecuados niveles de rentabilidad económica <sup>[1]</sup>.

En este sentido, se debe mencionar que la disponibilidad de tierras cultivables se reduce con gran rapidez en el mundo, a la vez que se produce un alto crecimiento poblacional. Razón por la cual, en busca de soluciones se ha encontrado el incremento del rendimiento en las cosechas, con el aumento de la protección de las plantas. Una contribución con dicho aspecto es el uso de inhibidores de proteasas con carácter bioinsecticida <sup>[9]</sup>.

Las proteasas, también llamadas enzimas proteolíticas, catalizan la degradación de proteínas mediante la hidrólisis de los enlaces peptídicos. De acuerdo con su grupo catalítico se clasifican en serino, aspártico, cisteíno y metalo peptidasas. En el último grupo se encuentran las carboxipeptidasas A, estas enzimas tienen en su centro activo el ion  $Zn^{2+}$  como cofactor necesario para su acción catalítica <sup>[10]</sup>.

Los inhibidores de proteasas (IPs) naturales son moléculas de origen proteico con bajo peso molecular. Están conformados por numerosos puentes disulfuro, lo que le atribuye la estabilidad frente al pH, fuerza iónica y temperatura <sup>[11]</sup>. Se han identificado alrededor de 352 inhibidores de proteasa vegetales con sus respectivos genes registrados en Plant-PIs <sup>[12]</sup>. Algunos ejemplos son el inhibidor de la tripsina de soya (Kunitz), inhibidor de tripsina de la cebada, inhibidor Bowman-Birk, inhibidor I y II en papa <sup>[13]</sup>.



Estos inhibidores son también de gran potencial a nivel de la medicina animal y humana para algunos tratamientos que involucran infecciones por virus, hongos y parásitos; procesos inflamatorios o de coagulación sanguínea; desórdenes neurovegetativos o daños al sistema inmunológico, cardiovascular, respiratorio <sup>[14]</sup>.

Existen IPs sintéticos en la terapia contra el VIH-SIDA, que también se han evidenciado como antagonistas del EGF (factor de crecimiento epidérmico) en el desarrollo antitumoral *in vitro* e *in vivo* <sup>[15;19]</sup>. A nivel de plantas, su importancia radica en los mecanismos de defensa contra fitopatógenos <sup>[15;16]</sup>.

Se conoce, además, que los insectos y los microorganismos fitopatógenos secretan enzimas extracelulares y, en particular, enzimas proteolíticas que degradan proteínas (rol importante en la patogénesis) <sup>[15]</sup>, como en el caso de los ácaros de polvo o de productos almacenados y el pulgón *A. pisum*, que en su sistema digestivo poseen significativa actividad carboxipeptidásica; en el caso de coleópteros se ha detectado alta actividad cisteína proteásica, aminopeptidásica y carboxipeptidásica; y en el caso de lepidópteros, ortópteros, dípteros e himenópteros actividad serino proteásica, pero también aminopeptidásica y carboxipeptidásica <sup>[9]</sup>.

En resumen, las plantas de forma natural han desarrollado mecanismos para combatir a organismos patógenos, una estrategia importante se relaciona con los inhibidores proteolíticos que actúan contra ellos <sup>[15;16]</sup>.

Los IPs se encuentran en las plantas e impiden la acción de las proteasas en el aparato digestivo de los animales, lo cual reduce el suministro de aminoácidos esenciales, que detiene su desarrollo y provoca su muerte <sup>[16; 11; 23]</sup>. Su mecanismo de inhibición depende del tipo de inhibidor si es competitivo, acompetitivo, no competitivo o mixto <sup>[17]</sup>. Un caso es el inhibidor de carboxipeptidasa A de 4,0-4,2 kDa <sup>[18;13]</sup> obtenido de la papa, su acción se basa en la imitación de la unión del sustrato al sitio catalítico de la enzima, con lo cual el carboxilo terminal del inhibidor interactúa con el ion zinc y lo bloquea <sup>[19;20]</sup>.

Los IPs en su mayor parte se ubican de forma macro en los granos de reserva de las plantas en una concentración alrededor de 5-15 % de la proteína total, porque son los órganos indispensables para la reproducción y sobrevivencia de las especies <sup>[21; 22]</sup>. Además, se encuentran en tejidos como brotes y hojas por ser susceptibles al ataque de organismos patógenos; e incluso en raíces de acuerdo con los patrones de expresión conseguidos a través de RT-qPCR (reacción de la cadena de polimerasa cuantitativa a tiempo real) <sup>[11;9]</sup>. En lo micro se localiza dentro de las vacuolas de las células parenquimáticas centrales en tallos y hojas, conjuntamente dentro del tejido cortical de los tubérculos de papa <sup>[20]</sup>.

En general, la función de los IPs en las plantas es la regulación de las actividades que involucren a proteínas, y protección a tejidos, de esta manera evitan la degradación no deseada. Aparecen de forma natural en el crecimiento y decrecen en la maduración del fruto, debido a que la planta requiere ayuda de los animales para dispersar las semillas, como en el caso de los tubérculos <sup>[24; 18]</sup>. No obstante, cuando hay lesiones por ataque de un fitopatógeno, los IPs se activan, he inician una ruta de señales, que después se traducirán en respuesta al daño <sup>[24]</sup>. La respuesta a las señales se investigó en la expresión del gen de resistencia sistémica adquirida y se obtuvo que el responsable es el factor inductor inhibidor de proteínas, ubicado en el ápice y trasladado dentro del floema. Adicionalmente, comprobaron otras señales intracelulares y sustancias reguladoras que intervienen en la iniciación, como el gen que codifica los IPs. Este gen es activado gracias a lipasas, ácido abscísico y sistemina, que se liberan de la membrana plasmática <sup>[25]</sup>. La sistemina es una hormona vegetal oligopeptídica que tras una señal de herida se procesa y se libera en el apoplasto de la pared celular, donde se activa la producción de ácido jasmónico e induce la síntesis de IPs <sup>[26]</sup>.

El ciclo de desarrollo de la planta de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) en lo relevante se caracteriza al primer mes, con la semilla dicotiledónea emergente, se genera un pequeño talluelo hasta 6 hojas verdaderas, en tanto se colorean de amarillo las hojas cotiledonales, que caen y dejan cicatriz en el tallo. En este tiempo es susceptible a la agresión de insectos cortadores como *Copitarsia turbata*, *Epitrix subcrinita* y *Diabrotica sp.*, que suelen masticar sus hojas. Al tercer mes, las primeras hojas se desprenden, hay ramificación y se da el panojamiento, se observa la inflorescencia con los botones florales individuales; en esta etapa, la polilla (*Eurysacca quinoae*) es capaz de realizar minas en sus hojas. Finalmente, a los 6 meses la floración se completa y llega a la madurez fisiológica con un grano que muestra resistencia a la penetración y posee una humedad del 14-16 %. El ataque principal nocturno es el de la segunda generación de *Eurysacca quinoae*, que consume el grano <sup>[3;27]</sup>.

5



Trabajos de investigación desarrollados anteriormente bajo la línea de investigación de Síntesis Orgánica no Convencional, del Departamento de Ciencias Nucleares, sintetizaron matrices de afinidad de proteasa-glioxil-sepharosa, para purificar sus inhibidores específicos, que afectan la eficiencia de las reacciones bioquímicas que catalizan. El proyecto propuesto pretende también aislar, purificar y estudiar inhibidores de Carboxipeptidasa A presentes en los órganos de la planta de quinua, mediante un proceso de fácil escalado, para obtener estas biomoléculas por sus efectos cinéticos de interés biotecnológico.

**4 Productos esperados (marcar con una "X" al menos uno de los productos no señalados)**

| Tipo de Producto:   | Marcar con una "X" |
|---|--------------------|
| a. Disertación a la Comunidad Politécnica (obligatorio);  | X                  |
| b. Presentación de un artículo en formato de la Revista Politécnica (obligatorio)   | X                  |
| c. Proyecto de Titulación;  | X                  |
| d. Aplicación tecnológica construida o implementada;  |                    |
| e. Patente presentada;  |                    |
| f. Perfil de proyecto de mayor impacto científico, técnico, pedagógico o de innovación.   |                    |
| g. Publicaciones científicas indexada en SCIMAGO-SCOPUS/WoS/SCIELO/ Latindex Catálogo o un artículo en congreso indexado en SCOPUS. |                    |

**5 Descripción, metodología y diseño del proyecto**

**5.1 Descripción, metodología y diseño del proyecto**

Para el estudio de la actividad inhibidora de la enzima carboxipeptidasa A (CPA) se emplearán los principales órganos de la planta andina quinua (*Chenopodium quinoa* Willd): raíces, tallos y hojas.

**a. Establecer las condiciones de ensayo que permitan medir la actividad enzimática e inhibidora de la enzima carboxipeptidasa A (CPA), con hipuril-fenilalanina como sustrato**

Para medir la actividad enzimática (AE) de la Carboxipeptidasa A, en una celda de cuarzo se colocarán 2,9 mL de solución de hipuril-L-fenilalanina preparada en tampón tris-HCl 25 mM y NaCl 500 mM a pH 7,5, en un rango de concentración que permita obtener una relación lineal con la actividad enzimática; y, 0,1 mL de una solución de CPA (4-8 U/ml) a concentración 1 M de NaCl. Para cuantificar la hidrólisis espontánea (blanco) se añadirán 0,1 mL de 1 M de NaCl en reemplazo de la solución de CPA. En todos los casos, se medirá en el espectrofotómetro el incremento de la absorbancia de la mezcla a 254 nm por 3 min. La AE se calculará con la siguiente expresión <sup>[28; 29]</sup>:

$$AE \left( \frac{U}{mL} \right) = \frac{\Delta A_{254 \text{ nm}} / \text{min} \times VT \times F}{Co \times Ve \times A}$$

VT: Volumen total del ensayo (ml)

Co: Coeficiente de extinción del ácido hipúrico (L/mmol cm)

Ve: Volumen de enzima (ml)

A: Ancho de la celda (cm)

U: Cantidad de enzima que hidroliza 1.0 μmol de hipuril-L-fenilalanina/min

F: Factor de dilución

El término ΔA<sub>254nm</sub>/min representa la diferencia entre las pendientes de las curvas AE vs. t para la prueba enzimática y el blanco. Para el tratamiento de datos se realizará el diseño completamente al azar con un solo factor, en el cual la variable de respuesta es la actividad enzimática y los niveles de la concentración de

ce



sustrato serán 0,1-1,0 mM<sup>[29; 30; 31]</sup>. Se realizará cada muestra por triplicado, con 15 corridas experimentales. Los datos serán procesados en el programa Statgraphics Centurion XVI, a través de un ANOVA, con el 95 % de confianza

Para el estudio de la actividad inhibidora (AI), en una celda de cuarzo se colocarán 2,4 mL de hipuril-L-fenilalanina a la concentración seleccionada anteriormente y preparada en tampón tris-HCl 25 mM y NaCl 500 mM a pH 7,5; 0,1 mL de una solución de CPA (4 U/mL) en 1 M de NaCl; y, 0,5 mL del extracto inhibidor<sup>[32]</sup>. Se medirá en el espectrofotómetro el incremento de la absorbancia de la mezcla a 240 nm por 3 min<sup>[28]</sup>. La actividad inhibidora (AI) se determinará mediante la diferencia entre la actividad enzimática de CPA sin y con presencia del extracto inhibidor. Para determinar la actividad inhibidora específica (AIE) se dividirá la actividad inhibidora entre la concentración proteica, medida por el método de la absorbancia a 280/260. La AI/mL de solución inhibidora (AI') se recalculará con la siguiente expresión<sup>[33]</sup>:

$$AI' = AI \times \frac{Ve}{Vi}$$

AI: Actividad inhibidora por volumen de solución enzimática (U/mL)

Vi: Volumen de solución inhibidora (ml)

Ve: Volumen de enzima (ml)

#### **b. Seleccionar el órgano con mayor presencia del inhibidor de CPA en la primera etapa fenológica de la planta de quinua**

Se sembrarán semillas de quinua a 2-3 cm de profundidad en el terreno del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Santa Catalina (INIAP), a una altitud 3 058 msnm, que posee un suelo franco, arenoso, pH 8, con precipitación anual promedio de 1427 mm, a temperatura de 11,7 °C con buen drenaje, previamente arado a cincel con surcos de 60 cm. Después, será abonado con 100 kg de urea por ha. Se deshierbará el área de siembra cuando las plantas alcancen unos 20 cm de altura (30 días de siembra), luego un aporque a los 60 días<sup>[1]</sup>. Al cultivo se le aplicará agricultura de secano; es decir será programado para su siembra en Enero-Agosto, temporada de lluvia, para no utilizar riego<sup>[35]</sup>.

Al primer mes de crecimiento, se recolectarán al azar 200 plantas mediante un muestreo sistemático. Las muestras se ubicarán en un patrón regular en la zona de estudio<sup>[36]</sup>. Las hojas, tallos y raíz se congelarán por lo menos a -40 °C en un ultracongelador TEST Instruments, modelo TUC-86370 (-40 a -86 °C). Se pesará la bandeja con las plantas y se liofilizarán hasta alcanzar al menos 13 % de agua<sup>[37; 38; 3]</sup>.

Cada órgano se molerá y porciones de 5 g de harina se desengrasarán, durante 30 min, con 50 mL de acetona (-20 °C), hasta que no se visualice la presencia de turbidez en la acetona. Para retirar el excedente de acetona se filtrará en una bomba al vacío. Una vez filtrado el solvente, la muestra se secará a 37 °C durante 12 h<sup>[32]</sup>.

Se suspenderá la muestra en agua destilada 1:10 (p/v) y NaCl 0,5 M durante 1h con agitación<sup>[39]</sup>, luego se centrifugará a 6 000 x g durante 30 min para separar albuminas y globulinas (sobrenadante), de otras fracciones proteicas que interfieran con los inhibidores (precipitado)<sup>[40]</sup>.

Una vez obtenido el extracto acuoso crudo (sobrenadante), se someterá a ultrafiltración centrífuga a 50 kDa con 2 800 x g, durante 45 min. El retenido se desechará y el permeado se ultrafiltrará a la misma velocidad y tiempo con una membrana de 10 kDa,<sup>[41]</sup>. Se determinará la actividad inhibidora de CPA en el permeado y retenido.

El proceso descrito corresponde a un diseño factorial 3x2. El órgano de la planta (raíces, tallos y hojas) y la fracción (permeado y retenido) son los factores. La variable de respuesta es la actividad inhibidora específica. Se procesará cada muestra por triplicado, para un total de 18 corridas experimentales. El análisis de datos se realizará en el programa Statgraphics Centurion XVI, mediante un análisis de varianza (ANOVA), con el 95 % de confianza.

#### **c. Purificar y caracterizar el inhibidor de CPA más activo**



El inhibidor proteico de CPA, presente en el extracto del órgano de la planta con mayor actividad inhibidora específica, se purificará mediante cromatografía de filtración en gel; luego, se estimará su peso molecular por electroforesis y se caracterizará cinéticamente.

El retenido o permeado con mayor actividad inhibidora se someterá a una cromatografía de filtración en gel con el uso de una columna de vidrio empacada hasta 70 cm con un relleno de Sephadex G-50. Se empacará la suspensión del gel en una columna de 0,8 x 75 cm y se equilibrará con tampón Tris-HCl pH 7,5 durante 30 min, entonces se alimentarán 2 ml de extracto y se pasará tampón Tris-HCl, hasta que la concentración de proteína en el efluente de la columna sea cero <sup>[42]</sup>. En las fracciones recolectadas se medirá la concentración de proteína por el método de densidad óptica 280/260 nm <sup>[43]</sup>, la AI y la AIE.

Se efectuará una electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) de las fracciones activas, para lo cual se desnaturalizarán a 90 °C, durante 10 min (SDS al 14%, glicerol al 12%, 0,05 M de Tris-HCl pH 6,8, mercaptoetanol al 2 % de y azul de bromofenol al 0,01 %) en relación 1:1 (v/v). Para la corrida electroforética: se usará gel separador con 16 % de poli(acrilamida) con 10,6 % de glicerol; 33,0 % de tampón de gel y 22,7 % de agua. El gel concentrador se preparará con 5 % de poli(acrilamida), 33,0 % de tampón de gel y 57,0 % de agua. La polimerización de los geles se llevará a cabo con la adición de 150 µL de persulfato de amonio y 15 µL de TEMED. Se cargará el estándar y 30 µL de cada muestra desnaturalizada (1 mg/mL) en el gel de poli(acrilamida). Las placas se colocarán dentro de la cámara electroforética. Se adicionará el tampón del ánodo (0,20 M Tris pH 8,90) y del cátodo (0,10 % SDS; 0,93 M glicina y 0,03 M Tris pH 8,25), con voltaje de 110 V y 150 V. Concluida la corrida, los geles se sumergirán en una solución fijadora (50,0 % de metanol y 7,0 % de ácido acético), durante 30 min y se teñirán en solución de coloración (45,35 % de metanol; 0,1 % de azul de Coomassie R-250 y 4,6 % de ácido acético) por 12 h. El desteñido de los geles se realizará en microondas, a 1400 kW, durante 1 min, en una solución decolorante (5,0 % de ácido acético y 50,0 % de metanol) <sup>[44]</sup>.

Para la segunda parte la constante de inhibición (K<sub>i</sub>), se determinará de acuerdo con el gráfico de los dobles recíprocos, de Lineweaver-Burk, para las reacciones enzimáticas de la CPA con extractos y sin extractos inhibidores <sup>[17]</sup>. Además, se realizará la curva dosis – respuesta de la inhibición de CPA, para encontrar el valor de IC<sub>50</sub>, con el empleo de los extractos crudos de quinua preparados a distintas concentraciones proteicas desde 0,01 a 6 mg/ml <sup>[32]</sup>.

#### d. Evaluar el efecto producido por una herida mecánica en la actividad inhibidora de CPA de hojas de quinua en las tres etapas fenológicas

Durante las etapas de crecimiento se recolectarán al azar 200 plantas mediante un muestreo sistemático. Las fases escogidas para muestrear el órgano serán a los 31 días, cuando la planta tenga 6 hojas; a los 90 días, en el panojamiento; y a los 180 días, en la madurez fisiológica <sup>[26; 3]</sup>. Se les realizará una herida (nivel 4) con un hemostato, perpendicular al nervio central en el 50% de las hojas más bajas. Transcurridas 48 h de la herida, serán recolectadas las muestras <sup>[18]</sup>. Se realizará el proceso descrito anteriormente: se liofilizará, molerá, desengrasará, semipurificará y se determinará concentración proteica, la AI y la AIE.

El proceso descrito corresponde a un diseño factorial 3×2. El daño mecánico (presencia y ausencia) y el tiempo de desarrollo de la planta (30, 90 y 180 días) serán las variables de diseño. La variable de respuesta será la actividad inhibidora específica. Se realizará cada muestra por triplicado, con 18 corridas experimentales. Los datos serán procesados en el programa Statgraphics Centurion XVI, a través de un ANOVA, con el 95 % de confianza

- [1] INIAP (2014). *Quinua*. Recuperado de <http://tecnologia.iniap.gob.ec/index.php/explore-2/mgranos/rquinua> (Abril, 2014).
- [2] Villacrés, E., y Quelal, M. (2014). La riqueza oculta de las hojas de Quinua. *Boletín Técnico de la Institución Nacional de Investigaciones Agropecuarias*, (166), 2-33
- [3] Molino, V. (2016). *Validación del protocolo de control interno de calidad para la producción de semilla de quinua variedad (INIAPtunkahuan), bajo dos tipos de fertilización, cadet, 2015*. (Pregrado). Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.
- [4] Ramiro, D. (2016). *Aislamiento y caracterización de las proteínas del grano de quinua (Chenopodium quinoa Willd) ecuatoriana, variedad INIAP-TUNKAHUÁN*. (Pregrado). Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.

5



- [5] MAGAP (2013). MAGAP fomenta producción de quinua con ferias inclusivas. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Recuperado de <https://www.agricultura.gob.ec/magap-fomenta-produccion-de-quinua-con-ferias-inclusivas/> (Abril, 2019)
- [6] Márquez, C. (2016). Tres factores impactan a la venta de quinua. Recuperado de <https://www.revistalideres.ec/lideres/quinua-venta-sobreproduccion-mercado-internacional-competencia.html> (Abril, 2019)
- [7] Arias, A. (2017). *Fomento a la producción de quinua y sus derivados para la diversificación de exportaciones no tradicionales en el periodo 2009-2015*. (Pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- [8] MAGAP (2013). *Ecuador quintuplicará producción de quinua*. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Recuperado de <https://www.agricultura.gob.ec/ecuador-quintuplicara-produccion-de-quinua/> (Abril, 2019)
- [9] Carillo, L. (2009). *Cistatinas de cebada: proteínas de defensa contra artrópodos*. (Doctorado). Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, España.
- [10] Taco, D. (2018). *Obtención y Caracterización de inhibidores de pepsina provenientes de semilla de amaranto, arveja, chocho, frejol, quinua o sangorache, mediante un sistema de purificación que emplee cromatografía de afinidad*. (Pregrado). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.
- [11] Tellechea, M. (2017). *Purificación, clonación y expresión de inhibidores peptídicos de proteasas de potencial aplicación biomédica a partir de Solanum tuberosum spp* (Doctorado). Universidad Nacional de la Plata, La Plata, Argentina.
- [12] Leo, F. (2002). PLANT-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes. *Nucleic Acids Research*, 30(1), 347-348. doi: 10.1093/nar/30.1.347
- [13] Ryan, C. (1990). Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 28(1), 425-449. doi: 10.1146/annurev.py.28.090190.002233
- [14] Tellechea, M. (2012). *Obtención de inhibidores peptídicos de proteasas a partir de extractos de Solanum tuberosum variedad andígena subvariedad churqueña* (Pregrado). Universidad Nacional de la Plata, La Plata, Argentina.
- [15] Habib, Huma y Majid, Khalid. (2007). Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology Review*. 2 (3), 67-85. Recuperado de <http://www.Academicjournals.org/BMBR> (Mayo, 2019)
- [16] Lawrence, P., y Koundal, K. (2002). Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic Journal of Biotechnology*, 5 (1), 93-109. doi: 10.2225/vol5-issue1-fulltext-3
- [17] Nelson, D., y Cox, M. (2017). *Lehninger principles of biochemistry*. New York, EE. UU.: W.H. Freeman/Macmillan Learning.
- [18] Graham, J., y Ryan, C. (1981). Accumulation of a metallo-carboxypeptidase inhibitor in leaves of wounded potato plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 101(4), 1164-1170. doi: 10.1016/0006-291x(81)91570-9
- [19] Aparicio, C. (1998). *El inhibidor de carboxipeptidasa de patata (PCI): un antagonista del EGF con actividad antitumoral*. (Doctorado). Universitat de Girona, Girona, España.
- [20] García, M. (2017). *Caracterización estructural y funcional de dos metalo-carboxipeptidasas de la familia M14 con especificidad de sustrato tipo ácido: carboxipeptidasa 0 humanas*. (Doctorado). Universidad Autónoma de Barcelona.
- [21] Vivanco, J., Cosío, E., Loyola-Vargas, V., y Flores, H. (2005). Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación y Ciencia*. 22 (1), 1-8. Recuperado de <https://www.uv.mx/personal/tcarmona/files/2010/08/Vivanco-et-al-2005.pdf> (Mayo, 2019).
- [22] Carlini, C., y Grossi-de-Sá, M. (2002). Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, 40(11), 1515-1539. doi: 10.1016/s0041-0101(02)00240-4
- [23] Bayes, A., Comellas-Bigler, M., de la Vega, M., Maskos, K., Bode, W., y Aviles, F. et al. (2005). Structural basis of the resistance of an insect carboxypeptidase to plant protease inhibitors. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 102(46), 16602-16607. doi: 10.1073/pnas.0505489102
- [24] Blanco-Labra, A., y Aguirre Mancilla, C. (2002). Proteínas Involucradas en los Mecanismos de Defensa de Plantas. *Acta Universitaria*, 12 (3), 3-28
- [25] Camarena-Gutiérrez, G., y Torre-Almaráz, R. (2007). Systemic acquired resistance in plant: state of art. *Revista Chapingo Serie ciencias forestales y del ambiente*, 13(2), 158. Recuperado de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S2007-40182007000200157&lng=pt&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2007-40182007000200157&lng=pt&nrm=iso&tlng=en) (Mayo, 2019)
- [26] Narváez, J., y Orozco, M. (2008). Systemins and AtPeps: Defense-Related Peptide Signals. *Induced Plant Resistance to Herbivory*. 313-328. doi: 10.1007 / 978-1-4020-8182-8\_15



- [27] Mujica, A., Canahua, A., y Saravia, R. (2019). *Capítulo II: agronomía del cultivo de la quinua*. Recuperado de [http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP\\_FaoRlc/old/prior/segalim/prodalim/prodveg/cdrom/contenido/libro03/cap2.htm](http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP_FaoRlc/old/prior/segalim/prodalim/prodveg/cdrom/contenido/libro03/cap2.htm) (Abril, 2019)
- [28] Tardioli, P., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J., y Giordano, R. (2003). Design of New Immobilized-Stabilized Carboxypeptidase A Derivative for Production of Aromatic Free Hydrolysates of Proteins. *Biotechnology Progress*, 19 (2), 565-574. doi: 10.1021/bp0256364
- [29] MERCK (2019). *Enzymatic Assay of Carboxypeptidase A*. Recuperado de <https://www.Sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-carboxypeptidase-a.html> (Abril, 2018).
- [30] Folk, J., y Schirmer, E. (1963). The Porcine Pancreatic Carboxypeptidase A System. *The Journal Biological Chemistry*, 233(12), 1-12
- [31] Vértesi, A., Simon, L., Kiss, I., y Szajáni, B. (1999). Preparation, characterization and application of immobilized carboxypeptidase A. *Enzyme and Microbial Technology*, 25(1-2), 73-79. doi: 10.1016/s0141-0229(99)00007-1
- [32] Flores, D. (2018). *Cribado, purificación, caracterización bioquímica y proteómica de inhibidores de proteasas a partir de extractos biológicos latinoamericanos*. (Masterado). Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.
- [33] Echeverría, P. (2014). *Purificación y caracterización de inhibidores de tripsina provenientes de semillas de amaranto, arveja, chocho, frejol y sangorache, mediante cromatografía de afinidad*. (Pregrado). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.
- [34] Garofalo, J. (2006). *Evaluación de la aptitud combinatoria general y específica en 21 progenies de papa Solanum phureja para resistencia a "Tizón tardío" (Phytophthora infestans)* (Pregrado). Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.
- [35] Meseth, E. y Yu, J. (2014). Mejora en los calendarios de cultivo para agricultura de secano en ceja de selva. *Scientia Agropecuaria*. 5(4), 187-197. ISSN 2077-9917.
- [36] Mostacedo, B. (2000). *Manual de Métodos Básicos de Muestreo y Análisis en Ecología Vegetal*. Santa Cruz, Bolivia: Editora El País
- [37] Cerezal, D., Urtuvia, V., Ramirez, V., Romero, N., y Arcos, R. (2011). Desarrollo de producto sobre la base de harinas de cereales y leguminosa para niños celíacos entre 6 y 24 meses; I: *Formulación y aceptabilidad*. *Nutrición Hospitalaria*, 26(1), 152-160. doi: 10.3305/nh.2011.26.1.4862
- [38] Ramírez, J. (2014). *Optimización experimental del proceso de liofilización de estragón ruso (Artemisia dracunculul)*. (Masterado). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- [39] Moscoso-Mujica, G., Zavaleta, A., Mujica, Á., Santos, M., y Calixto, R. (2017). Fraccionamiento y caracterización electroforética de las proteínas de la semilla de kañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen). *Revista Chilena De Nutrición*, 44(2), 144-152. doi: 10.4067/s0717-75182017000200005
- [40] Elsohaimy, S., Refaay, T., y Zaytoun, M. (2015). Physicochemical and functional properties of quinoa protein isolate. *Annals of Agricultural Sciences*, 60(2), 297-305. doi: 10.1016/j.aos.2015.10.007
- [41] Gonzalo, R. (2015). *Obtención de Extractos clarificados y concentrados de inhibidores de proteasas a partir de semillas de cereales y leguminosas seleccionadas*. (Pregrado). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador
- [42] Araujo, L. (2019). *Obtención de un Inhibidor de Carboxipeptidasa A, mediante la Extracción de Fracciones Proteicas Solubles provenientes de Semillas de Amaranto (Amaranthus caudatus l.) y Quinoa (Chenopodium quinoa)*. (Pregrado). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.
- [43] Johnson, M. (2012). *Cuantificación de proteínas: A review of protein quantitation assays and a survey about the protein assays based on 194 formal publications*. Synatom Research, Princeton, New Jersey, United States. [dx.doi.org/10.13070/mm.es.2.115](https://doi.org/10.13070/mm.es.2.115)
- [44] Unapanta, A. (2018). *Diseño de un sistema de purificación de inhibidores de carboxipeptidasa A, provenientes de semillas de leguminosas y cereales seleccionadas, que emplee cromatografía de afinidad*. (Pregrado). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.





