

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y
AGROINDUSTRIA**

**OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CLARIFICADOS Y
CONCENTRADOS DE INHIBIDORES DE PROTEASAS A PARTIR
DE SEMILLAS DE CEREALES Y LEGUMINOSAS
SELECCIONADAS**

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

GONZALO RAFAEL JÁCOME CAMACHO
gonzalo.jacome@est.epn.edu.ec

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

Quito, mayo 2015

© Escuela Politécnica Nacional 2015
Reservados todos los derechos de reproducción

DECLARACIÓN

Yo, Gonzalo Rafael Jácome Camacho, 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.

Gonzalo Rafael Jácome Camacho

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Gonzalo Rafael Jácome Camacho, bajo mi supervisión.

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

AUSPICIO

La presente investigación contó con el auspicio financiero del proyecto PIS-2013-28 “Evaluación de la actividad biológica de inhibidores de proteasas aislados y purificados a partir de semillas de amaranto, arveja, chocho, fréjol y sangorache”, que se ejecutó en el Departamento de Ciencias Nucleares.

AGRADECIMIENTOS

A Dios porque sin su bendita generosidad nada es posible.

A mi madre Mercedes por brindarme su apoyo incondicional durante toda mi vida, a mi padre Edison por ser el mejor ejemplo de superación, a mis hermanos Gabriela, Erika, Tomas y Daniela (†) por compartir su cariño.

A toda mi familia en especial a mis abuelos Armando y Doraliza porque guiaron mis primeros pasos y se convirtieron en la inspiración de mis estudios.

A la Sra. Barbarita por acogerme como a un hijo desde que me propuse alcanzar esta meta.

Al Dr. Patricio Castillo por permitirme formar parte de este proyecto, por compartir sus conocimientos, por su guía y paciencia en todas las etapas de la investigación.

A la Dra. Florinella Muñoz por facilitar el uso de los laboratorios del Departamento de Ciencias Nucleares para la ejecución del proyecto, por sus consejos, en especial en la asignatura de Metodología de la Investigación Científica, que contribuyeron en el planteamiento y desarrollo de este trabajo.

Al Ing. Marquito y a Pao por ser los mejores aliados de los tesisistas de DCN, por su colaboración en el perfeccionamiento del documento final y en especial por su amistad.

A mis amigos José Luis, Raúl, Gaby, Ruth, Maribel y Alexandra con quienes he compartido los triunfos y derrotas durante nuestros estudios en la EPN.

A todas las personas que de cualquier manera aportaron para la consecución de esta meta.

DEDICATORIA

A mis abuelos Armando y Doraliza por convertirse en la inspiración de mi vida.

A la memoria de mi querida hermana Daniela que seguro estaría orgullosa de este objetivo alcanzado.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	PÁGINA
GLOSARIO	xiii
NOMENCLATURA	xiv
RESUMEN	xv
INTRODUCCIÓN	xvii
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
1.1. Cereales y leguminosas	1
1.1.1. Generalidades	1
1.1.2. Usos e importancia económica de los cereales y leguminosas en la región Andina	2
1.1.3. Amaranto y sangorache	3
1.1.3.1. Origen	3
1.1.3.2. Identificación taxonómica	4
1.1.3.3. Aspectos agroecológicos	5
1.1.3.4. Composición química	5
1.1.4. Arveja, chocho y fréjol	6
1.1.4.1. Origen	6
1.1.4.2. Identificación taxonómica	7
1.1.4.3. Aspectos agroecológicos	8
1.1.4.4. Composición química	8
1.2. Proteasas	9
1.2.1. Generalidades	9
1.2.2. Clasificación de las proteasas	10
1.2.2.1. Tripsina	12
1.2.2.2. Quimotripsina	13
1.2.2.3. Papaína	14
1.2.2.4. Carboxipeptidasa A	15
1.2.3. Inhibidores de proteasas	16
1.2.3.1. Generalidades	16
1.2.3.2. Inhibidores de proteasas en plantas	18
1.2.3.3. Clasificación de los inhibidores de proteasas	19
1.2.3.4. Caracterización de los IPs	19
1.2.3.5. Aplicaciones de los inhibidores de proteasas	24
1.3. Purificación de proteínas a escala piloto	26
1.3.1. Generalidades	26
1.3.2. Métodos de purificación de proteínas	27
1.3.2.1. Cromatografía de exclusión molecular	28
1.3.2.2. Ultrafiltración centrífuga	29
1.3.2.3. Precipitación con solventes orgánicos	30
1.3.2.4. Tratamiento térmico	31
1.3.2.5. Cromatografía de afinidad	31
1.3.3. Producción de biomoléculas a escala piloto	32

1.3.3.1. Ingeniería conceptual	33
1.3.3.2. Ingeniería básica	34
1.3.3.3. Ingeniería de detalle	36
2. PARTE EXPERIMENTAL	39
2.1. Materiales y equipos	39
2.1.1. Materiales	39
2.1.2. Equipos	39
2.1.3. Reactivos	40
2.2. Obtención de extractos acuosos clarificados a partir de semillas de amaranto (<i>Amaranthus caudatus L.</i>), arveja (<i>Pisum sativum L.</i>), chocho (<i>Lupinus mutabilis</i>), fréjol (<i>Phaseolus vulgaris L.</i>) y sangorache (<i>Amaranthus hybridus L.</i>)	41
2.2.1. Desengrasado de las harinas de las semillas	41
2.2.2. Obtención de extractos crudos de las harinas de las semillas	42
2.2.3. Determinación de la concentración de proteína	42
2.3. Determinación de la actividad inhibidora frente a carboxipeptidasa A, papaína o quimotripsina, en los extractos obtenidos	44
2.3.1. Actividad inhibidora frente a tripsina del extracto de semillas de sangorache	45
2.3.1.1. Determinación de la actividad inhibidora frente a tripsina, producida por el extracto crudo de semillas de sangorache, con BApNA como sustrato	45
2.3.1.2. Determinación de la actividad inhibidora frente a tripsina, producida por el extracto crudo de semillas de sangorache, con caseína como sustrato	46
2.3.2. Actividad inhibidora frente a carboxipeptidasa A, papaína y quimotripsina producida por los extractos crudos	48
2.3.2.1. Determinación de la actividad inhibidora frente a CPA producida por los extractos crudos de las cinco especies, bajo nuevas condiciones de experimentación	48
2.3.3. Determinación de la actividad inhibidora específica	49
2.3.4. Selección de los extractos con mayor AIE para carboxipeptidasa A, papaína o quimotripsina	49
2.4. Purificación y caracterización bioquímica de la fracción inhibidora más activa de cada una de las proteasas	50
2.4.1. Purificación del extracto inhibidor más activo frente a cada una de las proteasas	50
2.4.2. Concentración de las muestras por evaporación	50
2.4.3. Caracterización bioquímica de la fracción inhibidora más activa de cada una de las proteasas	51
2.4.3.1. Determinación del peso molecular de la fracción inhibidora más activa de cada una de las proteasas	51
2.4.3.2. Determinación del valor de IC ₅₀ de la fracción inhibidora más activa de cada una de las proteasas	52

2.5. Estudio de la estabilidad de las soluciones concentradas del inhibidor más activo frente a la temperatura de almacenamiento	53
2.5.1. Cálculo de la constante de inactivación	53
2.6. Diseño de una planta piloto para la obtención de inhibidores purificados de carboxipeptidasa A, papaína o quimotripsina	54
2.7. Evaluación de los costos del proyecto	55
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
3.1. Obtención de los extractos crudos a partir de semillas de amaranto, arveja, chocho, fréjol y sangorache	56
3.1.1. Obtención de los extractos crudos de las harinas de las semillas y determinación de la concentración de proteína	57
3.2. Determinación de la actividad inhibidora frente a carboxipeptidasa A, papaína o quimotripsina, en los extractos obtenidos	59
3.2.1. Evaluación de la actividad inhibidora frente a tripsina en el extracto crudo de sangorache, con caseína y BApNA como sustratos	59
3.2.2. Evaluación de la actividad inhibidora frente a papaína producida por los extractos de amaranto, arveja, chocho, fréjol y sangorache	60
3.2.3. Evaluación de la actividad inhibidora frente a quimotripsina producida por los extractos de amaranto, arveja, chocho, fréjol y sangorache	63
3.2.4. Evaluación de la actividad inhibidora frente a carboxipeptidasa A, producida por los extractos de amaranto, arveja, chocho, fréjol y sangorache	66
3.3. Purificación del extracto crudo con mayor actividad inhibidora para papaína y quimotripsina	70
3.3.1. Evaluación de la purificación de los extractos crudos de fréjol y chocho mediante filtración a 10 kDa	70
3.3.1.1. Evaluación del permeado y retenido del extracto de fréjol, obtenidos en la ultrafiltración centrífuga a 10 kDa	70
3.3.1.2. Evaluación del permeado y retenido del extracto de chocho, obtenidos en la ultrafiltración centrífuga a 10 kDa	72
3.3.2. Purificación de los extractos seleccionados, mediante tratamiento térmico	74
3.3.3. Purificación de los extractos seleccionados, mediante precipitación con ácido tricloroacético (TCA)	75
3.3.4. Purificación de los extractos mediante cromatografía de afinidad	80

3.3.4.1. Cromatografía de afinidad del permeado (<10 kDa) de las semillas de fréjol y evaluación de la actividad inhibidora frente a papaína	80
3.3.4.2. Cromatografía de afinidad del permeado (<10 kDa) de las semillas de chocho y evaluación de la actividad inhibidora frente a quimotripsina	82
3.4. Evaluación de los extractos semipurificados, concentrados mediante evaporación	85
3.5. Caracterización bioquímica de la fracción inhibidora más activa frente a papaína y quimotripsina	86
3.5.1. Determinación del peso molecular de la fracción inhibidora más activa frente a papaína y quimotripsina	86
3.5.2. Determinación del valor de IC ₅₀ de la fracción inhibidora más activa de papaína y quimotripsina	92
3.5.2.1. Cálculo del IC ₅₀ del extracto semipurificado de fréjol frente a papaína	93
3.5.2.2. Cálculo del IC ₅₀ del extracto semipurificado de chocho frente a quimotripsina	95
3.6. Estudio de la estabilidad de las soluciones concentradas del inhibidor más activo frente a la temperatura de almacenamiento	99
3.6.1. Evaluación del estudio de estabilidad del extracto inhibidor semipurificado de fréjol	99
3.6.2. Evaluación del estudio de estabilidad del extracto inhibidor semipurificado de chocho	101
3.7. Diseño de una planta piloto para la obtención de inhibidores purificados de carboxipeptidasa A, papaína o quimotripsina	103
3.7.1. Capacidad de la planta	104
3.7.2. Materia prima e insumos	105
3.7.3. Diseño del proceso de producción	105
3.7.4. Plano de simbología, abreviaturas y nomenclatura utilizada en equipos y líneas de corrientes	105
3.7.5. Descripción del proceso tecnológico	110
3.7.6. Balance de masa	111
3.7.7. Balance de energía	112
3.7.8. Requerimiento de vapor	113
3.7.9. Dimensionamiento del caldero	113
3.7.10. Diseño básico de la planta piloto	113
3.8. Evaluación de los costos del proyecto	114
3.8.1. Inversión total de la planta piloto	115
3.8.2. Amortización de la planta piloto	116
3.8.3. Consumo de energía de la planta piloto	116
3.8.4. Costo de la materia prima e insumos	117
3.8.5. Costo de mano de obra directa e indirecta	117
3.8.6. Resumen de la estimación del costo de producción	118

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	121
4.1. Conclusiones	121
4.2. Recomendaciones	123
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124
ANEXOS	138

ÍNDICE DE TABLAS

		PÁGINA
Tabla 1.1	Identificación taxonómica de amaranto y sangorache	4
Tabla 1.2	Composición química de semillas de amaranto y sangorache	6
Tabla 1.3	Identificación taxonómica de arveja, chocho y fréjol	7
Tabla 1.4	Aspectos agroecológicos de arveja, chocho y fréjol	8
Tabla 1.5	Composición química de semillas de arveja, chocho y fréjol	9
Tabla 1.6	Variación de las constantes cinéticas K_m y $V_{máx}$ según el tipo de inhibición	22
Tabla 1.7	Variación de K_m y $V_{máx}$ según el tipo de inhibición	23
Tabla 1.8	Inhibidores comerciales y su aprobación por la FDA	25
Tabla 1.9	Métodos de purificación de proteínas	28
Tabla 2.1.	Protocolo para la determinación de la concentración proteica por el método de Biuret	44
Tabla 2.2.	Condiciones de las enzimas y extractos para la determinación de la actividad inhibidora según el método establecido por Becker, Makkar y Siddhuraju	48
Tabla 3.1.	Número de contactos harina-solvente para la extracción de grasa de las harinas de las semillas y su rendimiento	57
Tabla 3.2.	Concentración de proteína en mg/mL de los extractos crudos, determinada según los métodos de absorción en el ultravioleta y Biuret	58
Tabla 3.3.	$AE_{papaina}$, AI, [P] y AIE producida por los extractos crudos de las cinco especies frente a papaína	60
Tabla 3.4.	$AE_{quimotripsina}$, AI, [P] y AIE producida por los extractos crudos de las cinco especies frente a quimotripsina	63
Tabla 3.5.	Actividad proteolítica en presencia y ausencia de los extractos crudos de las cinco especies, frente a CPA	66

Tabla 3.6.	Actividad proteolítica de carboxipeptidasa A en presencia y ausencia de los extractos crudos de las cinco especies	68
Tabla 3.7.	AI, [P] y AIE producida por el permeado y retenido del extracto de fréjol, filtrado a 10 kDa, frente a papaína	71
Tabla 3.8.	AI, [P], y AIE producida por el permeado y retenido del extracto de chocho, filtrado a 10 kDa, frente a quimotripsina	72
Tabla 3.9.	AI, [P], AIE de los permeados de los extractos de fréjol frente a papaína y chocho frente a quimotripsina, antes y después del tratamiento térmico	74
Tabla 3.10.	Concentración de proteína en los extractos semipurificados de fréjol y chocho, antes y después del tratamiento con TCA al 4 %	76
Tabla 3.11.	Concentración de proteína y pH de las fracciones obtenidas mediante la filtración en gel de los extractos de fréjol y chocho	78
Tabla 3.12.	AI, [P] y AIE de los permeados de los extractos de fréjol frente a papaína y chocho frente a quimotripsina, antes y después de la concentración por evaporación	85
Tabla 3.13.	Parámetros cinéticos de la actividad proteolítica de papaína en presencia y ausencia del extracto inhibidor semipurificado de fréjol a diferentes concentraciones de sustrato	95
Tabla 3.14.	Parámetros cinéticos de la actividad proteolítica de quimotripsina en presencia y ausencia del extracto inhibidor semipurificado de chocho a diferentes concentraciones de sustrato	98
Tabla 3.15.	Actividad inhibidora del extracto semipurificado de fréjol, frente a papaína almacenado a tres temperaturas durante cuatro semanas	99
Tabla 3.16.	Actividad inhibidora del extracto semipurificado de chocho, frente a quimotripsina almacenado a tres temperaturas durante cuatro semanas	101
Tabla 3.17.	Codificación de los equipos de la planta piloto	107
Tabla 3.18.	Simbología de los equipos utilizados en el PFD	109
Tabla 3.19.	Resumen del balance de masa en las corrientes 1 a la 9	111
Tabla 3.20.	Resumen del balance de masa en las corrientes 10 a la 18	112
Tabla 3.21.	Resumen del balance de masa en las corrientes 19 a la 27	112

Tabla 3.22.	Cantidad de energía requerida en los procesos con cambio de temperatura	113
Tabla 3.23.	Activos fijos, activos diferidos y capital inicial de la planta piloto	115
Tabla 3.24.	Amortización de la planta piloto a 10 años	116
Tabla 3.25.	Costos de la materia prima e insumos requeridos para producir 5 L/d de extracto con actividad inhibidora de papaína y quimotripsina	117
Tabla 3.26.	Salarios anuales de los trabajadores de la planta piloto	118
Tabla 3.27.	Costo de producción de 5 L/d de extracto semipurificado con actividad inhibidora de papaína y quimotripsina	119
Tabla AIII.1.	Soluciones preparadas para el análisis de electroforesis	145
Tabla AIII.2.	Preparación del gel separador al 15 % de acrilamida	146
Tabla AIII.3.	Preparación del gel concentrador al 4 % de acrilamida	147
Tabla AV.1.	Movilidad relativa de las bandas generadas por el estándar y las bandas generadas por las muestras de chocho y fréjol, respecto al frente electroforético	150
Tabla AVI.1.	Actividad proteolítica de papaína en presencia y ausencia del extracto semipurificado de fréjol a diferentes concentraciones de sustrato	152
Tabla AVI.2.	Valores inversos de la actividad proteolítica de papaína en presencia y ausencia del extracto semipurificado de fréjol a diferentes concentraciones de sustrato	153
Tabla AVI.3.	Actividad proteolítica de quimotripsina en presencia y ausencia del extracto semipurificado de chocho, a diferentes concentraciones de sustrato	156
Tabla AVI.4.	Valores inversos de la actividad proteolítica de quimotripsina en presencia y ausencia del extracto semipurificado de chocho a diferentes concentraciones de sustrato	157
Tabla AVII.1.	Calor específico del extracto del fréjol	159
Tabla AVIII.1.	Hoja de especificaciones técnicas del molino	161
Tabla AVIII.2.	Hoja de especificaciones técnicas de los tanques abiertos	162
Tabla AVIII.3.	Hoja de especificaciones técnicas de los elevadores de cangilones	163

Tabla AVIII.4. Hoja de especificaciones técnicas de los tanques con agitación	164
Tabla AVIII.5. Hoja de especificaciones técnicas del tanque de almacenamiento	165
Tabla AVIII.6. Hoja de especificaciones técnicas del recuperador de solventes	166
Tabla AVIII.7. Hoja de especificaciones técnicas del secador de bandejas	167
Tabla AVIII.8. Hoja de especificaciones técnicas de las centrifugas	168
Tabla AVIII.9. Hoja de especificaciones técnicas de los sistemas de filtración tangencial	169
Tabla AVIII.10. Hoja de especificaciones técnicas de la marmita	170
Tabla AVIII.11. Hoja de especificaciones técnicas del evaporador	171
Tabla AVIII.12. Hoja de especificaciones técnicas de la envasadora	172
Tabla AVIII.13. Hoja de especificaciones técnicas de la cámara de congelación	173
Tabla AXII.1. Activos fijos de la planta piloto	178
Tabla AXII.2. Activos diferidos y capital inicial de la planta piloto	179
Tabla AXII.3. Amortización de los activos fijos de la planta piloto, a 10 años	180
Tabla AXII.4. Amortización de los activos diferidos y capital inicial de la planta piloto, a 10 años	181
Tabla AXII. 5. Consumo energético de los equipos de la planta piloto	182

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1.1 Modelo tridimensional de tripsina	13
Figura 1.2 Modelo tridimensional de quimotripsina	14
Figura 1.3 Modelo tridimensional de papaína y representación de su centro activo	15
Figura 1.4 Modelo tridimensional de Carboxipeptidasa A	16
Figura 1.5 Representaciones gráficas de los dobles recíprocos a) inhibición competitiva, b) inhibición no competitiva, c) inhibición mixta	23
Figura 1.6 Procedimientos para escalar desde laboratorio a producción industrial	27
Figura 1.7 Representación esquemática de la cromatografía de exclusión molecular	29
Figura 1.8 Representación esquemática de la cromatografía de afinidad	32
Figura 3.1 Cromatograma del permeado (< 10 kDa) semipurificado de la semilla de fréjol	80
Figura 3.2 AI de las fracciones obtenidas en la purificación selectiva del extracto de la semilla de fréjol frente a papaína	81
Figura 3.3 Cromatograma del permeado (< 10 kDa) semipurificado de la semilla de chocho	83
Figura 3.4 Actividad inhibidora de las fracciones obtenidas en la purificación selectiva del extracto de la semilla de chocho frente a quimotripsina	84
Figura 3.5 Gel de la electroforesis de los extractos crudos de fréjol y chocho	87
Figura 3.6 Gel de la electroforesis de los extractos semipurificados de fréjol y chocho	88
Figura 3.7 Movilidad total del frente electroforético, 1) del estándar y de las muestras en el gel de la electroforesis de los extractos semipurificados de 2) chocho y 3) fréjol	89
Figura 3.8 Espectrograma obtenido en la espectrometría de masas MALDI-TOF con el extracto de fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	91

Figura 3.9	Espectrograma obtenido en la espectrometría de masas MALDI-TOF con el extracto de chocho (<i>Lupinus mutabilis</i>)	91
Figura 3.10	Actividad proteolítica de papaína en presencia y ausencia del extracto semipurificado de fréjol a diferentes concentraciones de sustrato	93
Figura 3.11	Linealización de las ecuaciones de Michaelis-Menten determinadas para la actividad proteolítica de papaína en presencia y ausencia del extracto semipurificado de fréjol a diferentes concentraciones de sustrato	94
Figura 3.12	Actividad proteolítica de quimotripsina en presencia y ausencia del extracto semipurificado de chocho a diferentes concentraciones de sustrato	96
Figura 3.13	Linealización de las ecuaciones de Michaelis-Menten determinadas para la actividad proteolítica de quimotripsina en presencia y ausencia del extracto semipurificado de chocho a diferentes concentraciones de sustrato	97
Figura 3.14	Actividad inhibidora del extracto semipurificado de fréjol almacenado a tres temperaturas durante cuatro semanas	100
Figura 3.15	Actividad inhibidora del extracto semipurificado de chocho almacenado a tres temperaturas durante cuatro semanas	102
Figura 3.16.	Diagrama de bloques del proceso de producción (BFD)	106
Figura 3.17.	Diagrama de flujo del proceso de producción (PFD)	108
Figura AI.1	Curva de calibración para la determinación de la concentración de proteína en mg/mL, por el método de Biuret	140
Figura AV.1	Curva de calibración del estándar aplicado en el primer carril de la electroforesis, al 20 % de poliacrilamida	151
Figura AIX.1.	Distribución del área de producción (LAY OUT)	174
Figura AX.1	Elevación del área de producción, corte A-A'	175
Figura AX.2	Elevación del área de producción, corte B-B'	175
Figura AXI.1	Perspectiva 3D de la planta piloto	177
Figura AXII.1	Esquema organizacional de la planta piloto	183

ÍNDICE DE ANEXOS

	PÁGINA
ANEXO I	
Ejemplos de cálculo para la determinación de la concentración de proteína	139
ANEXO II	
Ejemplos de cálculo para la determinación de la actividad enzimática de tripsina, método desarrollado por Becker, Makkar y Siddhuraju, para la determinación de la actividad inhibidora de quimotripsina, determinación de la actividad inhibidora específica	141
ANEXO III	
Método para la electroforesis de los extractos crudos	145
ANEXO IV	
Ejemplos de cálculo para el balance de actividad inhibidora y el balance de cantidad de proteína	148
ANEXO V	
Pesos moleculares de las bandas del estándar y sus movilidades relativas. Cálculo del peso molecular de los extractos semipurificados de chocho y fréjol	150
ANEXO VI	
Cálculo del IC ₅₀ de los extractos semipurificados de fréjol y chocho	152
ANEXO VII	
Balance de energía de la planta piloto	159
ANEXO VIII	
Hojas de especificaciones técnicas de los equipos	161
ANEXO IX	
Distribución del área de producción (LAY OUT)	174
ANEXO X	
Elevaciones del área de producción	175
ANEXO XI	
Distribución de las áreas de producción, laboratorio, sanitarias y administrativas de la planta piloto	176
ANEXO XII	
Estimación del costo de producción de 5L/d de extracto semipurificado con actividad inhibidora de proteasas	178

GLOSARIO

Anfipática: Es la característica de una molécula que en su estructura posee un extremo hidrófilo y otro hidrófobo (Voet y Voet, 2006, p. 734).

Apoptosis: Es la muerte o destrucción celular programada que se realiza para el control y desarrollo del organismo al que pertenece (García et al., 2009, p. 76).

Aspectos agroecológicos: Son las características específicas de suelo y de clima requeridas por las plantas para su pleno desarrollo (Peralta et al., 2010, p. 25).

Centro activo: Es el sitio de la enzima donde se une el sustrato para que se produzca la catálisis. La estructura terciaria del centro activo es específica para el sustrato (Voet y Voet, 2006, p. 947).

IC₅₀: Es la concentración de una sustancia inhibidora requerida para disminuir la actividad enzimática a la mitad (Copeland, Lombardo, Giannaras y Decicco, 2005, p. 1 948).

Isómeros ópticos: Son moléculas que comparten casi todas sus propiedades, excepto la desviación de la luz que las atraviesa. El isómero que desvía la luz hacia la derecha se denomina dextrógiro; mientras el otro que desvía hacia la izquierda, se denomina levógiro (Voet y Voet, 2006, p. 80).

Merozoítos: Organismo producido por segmentación de un esquizonte durante la fase de reproducción asexual del ciclo vital de los esporozoos, concretamente del parásito de la malaria *Plasmodium* (Chassaingne, 2001, p. 85).

NOMENCLATURA

AE:	Actividad proteolítica o enzimática
AI:	Actividad inhibidora
AIE:	Actividad inhibidora específica
BAPNA:	N- α Benzoil, L-arginil p-nitroanilida
BFD:	Diagrama de bloques del proceso (siglas en inglés)
Cp:	Calor específico a presión constante
CPA:	Carboxipeptidasa A
DO:	Densidad óptica
FDA:	Administración de medicamentos y alimentos (siglas en inglés)
[I]:	Concentración del inhibidor
IP:	Inhibidor de proteasa
Ki:	Constante de inhibición equivalente a IC ₅₀
k _{int} :	Constante de inactivación
Km:	Constante de Michaelis-Menten
Lv:	Calor constante de vaporización
m:	Masa
MALDI:	Ionización láser asistida por matriz (siglas en inglés)
[P]:	Concentración de proteína
P&ID:	Diagrama de instrumentación y tuberías (siglas en inglés)
PAGE:	Electroforesis en geles de poliacrilamida (siglas en inglés)
PFD:	Diagrama de flujo del proceso (siglas en inglés)
Q:	Cantidad de energía calórica
SDS:	Dodecilsulfato sódico (siglas en inglés)
TCA:	Ácido tricloroacético (siglas en inglés)
TOF:	Analizador de tiempo de vuelo (siglas en inglés)
U:	Unidad enzimática
V _{máx} :	Velocidad máxima

RESUMEN

En la presente investigación se obtuvieron extractos clarificados y concentrados con actividad inhibidora frente a papaína y quimotripsina, provenientes de las semillas de amaranto (*Amaranthus caudatus L.*), arveja (*Pisum sativum L.*), chocho (*Lupinus mutabilis*), fréjol (*Phaseolus vulgaris L.*) y sangorache (*Amaranthus hybridus L.*), las mismas que fueron cultivadas, beneficiadas y donadas por el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP, Estación Santa Catalina).

Las harinas obtenidas a partir de las semillas mencionadas se desengrasaron y con ellas se prepararon extractos crudos mediante homogenización con tampón fosfato de sodio 50 mM; la mezcla se centrifugó a $2\ 800 \times g$ y el sobrenadante se ultrafiltró con centrifugación a 50 kDa. Se determinó la actividad inhibidora y actividad inhibidora específica de los extractos crudos frente a papaína, quimotripsina y carboxipeptidasa A. Los mejores resultados fueron obtenidos con el extracto crudo de fréjol frente a papaína con $4,95 \pm 0,15$ U/mg y con el extracto crudo de chocho frente a quimotripsina con $2,19 \pm 0,06$ U/mg.

Los extractos de fréjol y chocho fueron fraccionados con ultrafiltración centrífuga a 10 kDa, en los dos casos los permeados presentaron la mayor actividad inhibidora específica frente a papaína y quimotripsina, con valores de $5,53 \pm 0,38$ y $2,64 \pm 0,17$ U/mg, respectivamente.

Los permeados de los extractos de fréjol y chocho fueron purificados con tratamiento térmico a $60\ ^\circ\text{C}$, durante 30 min, y se obtuvieron valores de AEI iguales a $14,41 \pm 1,26$ y $6,61 \pm 0,55$ U/mg, frente a papaína y quimotripsina, respectivamente, lo que representa un grado de purificación de 2,61 y 2,50 veces en cada extracto.

Los extractos de fréjol y chocho se purificaron por cromatografía de afinidad en una matriz de tripsina-glioxil-sepharosa 6B-CL. Con el extracto de fréjol se obtuvo AIE frente a papaína en el primer pico del cromatograma, con un valor igual a

21,65 U/mg, que representa un grado de purificación de 1,5 veces, en un volumen total de 15 mL. De igual manera, con el extracto de chocho se obtuvo AIE frente a quimotripsina en el primer pico del cromatograma, con un valor igual a 7,46 U/mg, que representa un grado de purificación de 1,13 veces, en un volumen total de 12 mL.

Luego del tratamiento térmico, los extractos fueron concentrados mediante evaporación a una temperatura de 55 °C y una presión de vacío de 6 Pa, durante 4 min. El volumen de la muestra fue reducido 4 veces, aproximadamente, sin que exista pérdida de AIE. Este procedimiento concentró la proteína 3 veces para el fréjol y 4 veces para el chocho, con valores de $7,49 \pm 0,56$ y $17,83 \pm 1,02$ mg/mL, respectivamente.

Se determinaron los pesos moleculares de los inhibidores mediante electroforesis SDS-PAGE, cuyos resultados fueron 5,18 kDa para el inhibidor de chocho y 4,05 kDa para el inhibidor de fréjol. También se determinó el IC_{50} con valores de $0,018 \pm 0,0012$ y $0,107 \pm 0,021$ mM, frente a quimotripsina y papaína.

Se estudió la estabilidad de los extractos de fréjol y chocho a temperaturas de congelamiento (-20 °C), refrigeración (4 °C) y ambiente (17 °C), durante cuatro semanas. Los mejores resultados se obtuvieron a temperatura de congelamiento.

Se diseñó una planta a escala piloto para la obtención de 5 L/d de extracto semipurificado de fréjol y chocho con actividad inhibidora de papaína y quimotripsina. Se determinó el costo de producción, a escala piloto, de los extractos semipurificados en \$ 0,134/mg.

INTRODUCCIÓN

La producción de cereales y leguminosas generalmente se ha direccionado al consumo humano y animal, puesto que constituyen un alimento completo; sin embargo, en estos productos se han identificado otros compuestos denominados no nutritivos o antinutricionales, entre los cuales los más conocidos son los inhibidores de proteasas (IPs) (Elizalde, Porilla y Chaparro, 2009, p. 46).

Los IPs son proteínas solubles, de bajo peso molecular, en su mayoría termoestables, de origen animal o vegetal. Su estudio es de gran importancia, puesto que las enzimas que inhiben están involucradas no solo en procesos digestivos, sino también en la diferenciación celular, la defensa inmunológica, la apoptosis, la cicatrización de heridas, entre otros (Morales y Troncoso, 2012, p. 239; Vera, 2007, p. 409).

En la actualidad, se han descubierto aplicaciones importantes a los IPs, especialmente en el campo biotecnológico, en la biomedicina, en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades como el cáncer, el Alzheimer; desórdenes inmunológicos, infecciones respiratorias; infecciones parasitarias, fúngicas y virales, como la malaria y el VIH (García et al., 2009).

La costa y la amazonia ecuatoriana se han visto afectados por la malaria en alrededor de 5 000 casos en los últimos 5 años y, pese a los esfuerzos del Ministerio de Salud Pública del Ecuador, no se ha podido erradicar. Según la OMS, a nivel mundial 3 300 millones de personas tienen riesgo de contraer esta enfermedad (Páez, 2013, p. 7).

La malaria es una enfermedad transmitida por mosquitos y provocada por parásitos del género *Plasmodium*, los mismos que en su proceso de reproducción utilizan diversas proteasas (Benítez, 2005, p. 110). Las proteasas involucradas en la reproducción del *Plasmodium* pueden ser inhibidas, e impiden así la proliferación parasitaria.

La investigación propuesta busca identificar inhibidores de proteasas presentes en las semillas de amaranto, arveja, chocho, fréjol y sangorache, que en trabajos futuros podrían ser ensayadas frente a proteasas del *Plasmodium*.

En estudios anteriores, como el desarrollado por Muñoz (2011), se evidenció la presencia de inhibidores de tripsina en algunas variedades de leguminosas. Los mejores resultados se obtuvieron en chocho (*L. mutabilis*, var. INIAP-450 Andino), fréjol (*P. vulgaris*, var. INIAP-414 Yunguilla), arveja (*P. sativum*, var. INIAP-432 Lojanita), entre otros (p. 73). El amaranto (*Amaranthus caudatus* L.) y el sangorache (*Amaranthus hybridus* L.) tienen un elevado contenido de carbohidratos y proteínas; según el estudio desarrollado por Gómez (2013), en las semillas de estos pseudo cereales también se ha identificado un alto contenido de inhibidores de proteasas (p. 14).

El presente trabajo propone una estrategia para obtener extractos acuosos clarificados y concentrados provenientes de amaranto, arveja, chocho, fréjol y sangorache, mediante técnicas de ultrafiltración, calóricas y cromatográficas y ensayar su actividad inhibidora frente a carboxipeptidasa A, papaína y quimotripsina.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. CEREALES Y LEGUMINOSAS

1.1.1. GENERALIDADES

En Ecuador, los cereales y leguminosas constituyen el grupo más importante de la actividad agrícola; su producción generalmente se ha direccionado al consumo humano y animal, puesto que constituyen un alimento completo: los cereales como principales contribuyentes de carbohidratos y las leguminosas, de proteínas, incluso, como sustituyentes de las proteínas de origen animal, en zonas rurales de bajos ingresos económicos (Peralta et al., 2012, p. 11).

Según la Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria (ESPAC) y el III Censo Nacional Agropecuario, la superficie de labor agrícola y ganadera, para el año 2013, fue de 7,13 millones ha, de las cuales el 13,70 % corresponde a cultivos transitorios, como maíz, arveja, fréjol. De los cultivos transitorios, más del 80 % son cereales y leguminosas (ESPAC, 2013, p. 8), es decir que, alrededor de 800 000 ha se destinan al cultivo de maíz, arroz, fréjol, trigo y cebada, por mencionar los más importantes.

Leguminosas andinas, como el chocho, han tenido un aumento en la superficie de siembra en los últimos años, debido a la investigación que realiza el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) para la creación de nuevas variedades y manejo adecuado de los cultivos. Estos productos se caracterizan por su alto contenido y calidad de proteína (15-45 %), fibra, grasa (omega 3 y 6) y carbohidratos (Peralta et al., 2012, p. 7).

Otros granos, como el amaranto y el sangorache, son relativamente desconocidos, aunque su consumo data desde la existencia de algunas culturas precolombinas de América. El amaranto fue el principal aportante de proteína para etnias como los Aztecas, Mayas e Incas; y, en la actualidad, junto con el

sangorache son una buena alternativa para la agricultura de pequeños y medianos productores, por su fácil adaptación en zonas entre los 2 000 y 3 000 m.s.n.m., entre otras razones (Peralta et al., 2012, p. 7; Mujica, Berti e Izquierdo, 1997, p. 4).

Así también, es importante destacar la presencia mundial que tienen los cereales, con preferencias según las culturas gastronómicas, por ejemplo el trigo en Europa, el maíz en América, el arroz en Asia y el sorgo en África, todos como fuentes ricas en carbohidratos y, en la mayoría de los casos, de costo accesible (Espinoza y Quispe, 2011, p. 5).

1.1.2. USOS E IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LOS CEREALES Y LEGUMINOSAS EN LA REGIÓN ANDINA

La producción de cereales y leguminosas se direcciona especialmente al consumo humano de forma directa o indirecta, a través de la alimentación animal. Se consumen casi todas las partes de la planta, en especial las semillas y follaje; las leguminosas también se usan como fijadoras de nitrógeno, cobertura de suelos para evitar la erosión o control de plagas; y, los cereales, como biomasa para agregar al suelo y aumentar el contenido de materia orgánica (Arévalo y Díaz, 2010, p. 1).

La agroindustria de los cereales es muy variada y puede ser simple como elaborar un pan o compleja como fabricar un whisky. Existe una amplia gama de productos que pueden ser obtenidos de las semillas de cereales y leguminosas, de forma artesanal como reventados, cocidos, tostados, harinas, o de forma industrial, como snacks, bebidas alcohólicas, entre otros (Espinoza y Quispe, 2011, p. 5).

También se conocen aplicaciones en la medicina, biotecnología, en la industria de detergentes, colorantes, plaguicidas y fertilizantes. Estos usos no son muy extensos, pero implican un elevado rédito económico. Su investigación se ha direccionado a materias primas tradicionales como el arroz, maíz o soya, sin

considerar otras semillas como el chocho, fréjol, amaranto o sangorache, que por su componentes pueden ser fuentes idóneas de nuevos productos no alimenticios (Elizalde, Porilla y Chaparro, 2009, p. 10).

En cuanto a la importancia económica, los cereales y leguminosas se consumen ampliamente, ya que aportan el 90 % de la energía requerida por el ser humano de forma directa o indirecta, y son fuentes primarias de proteína en zonas geográficas vulnerables de la región andina. La adaptabilidad en casi todos los pisos climáticos, la resistencia a factores bióticos y abióticos como plagas, enfermedades, heladas y sequías, convierten a estos productos en la fuente de ingresos económicos más representativa del sector rural andino (Peralta et al., 2012, p. 11; Mujica et al., 1997, p. 7).

En Ecuador, el consumo per cápita de chocho, fréjol y arveja está en un rango de 0,4 a 0,8 kg mensual, este valor depende de la región; por ejemplo, el chocho tiene mayor aceptación en la Sierra y el fréjol en la Costa. Según estudios de mercado que se realizaron a estos productos desde 1989 hasta la actualidad, existe un aumento del 40 % en su consumo (Caicedo y Peralta, 2012, p. 9).

1.1.3. AMARANTO Y SANGORACHE

1.1.3.1. Origen

Se conocen más de 70 especies que corresponden al género *Amaranthus*, de las cuales el 70 % son de origen americano y el resto tiene orígenes dispersos en Europa, África y Asia (Espinoza y Quispe, 2011, p. 13).

El amaranto (*Amaranthus caudatus L.*) y el sangorache (*Amaranthus hybridus L.*) son originarios de la zona Andina de América. Hallazgos arqueológicos revelan que su consumo data desde hace 4 000 años. Las semillas y especialmente las hojas formaban parte importante de la dieta Azteca, Maya e Inca (Herrera y Montenegro, 2012, p. 51).

La colonización española prohibió el cultivo y consumo de estos pseudo cereales, por su uso en ritos religiosos, y desde entonces la producción se ha mantenido solo en lugares muy apartados y su uso se restringió a la alimentación animal; sin embargo, desde la década de los 80 se reactivó la producción de estos granos andinos por poseer mejores características en comparación con los cereales comunes, en especial en la concentración de proteína (12-19 %) y de aminoácidos como lisina (Herrera y Montenegro, 2012, p. 54).

1.1.3.2. Identificación taxonómica

En la Tabla 1.1 se presenta la identificación taxonómica del amaranto y el sangorache.

Tabla 1.1 Identificación taxonómica de amaranto y sangorache

REINO	Plantae
DIVISIÓN	Magnoliophyta
TIPO	Embryophyta siphonogama
SUBTIPO	Angiosperma
CLASE	Magnoliopsida
SUBCLASE	Archyclamidae
ORDEN	Caryophyllales
FAMILIA	Amaranthaceae
GÉNERO	<i>Amaranthus</i>
SECCIÓN	<i>Amaranthus</i>
ESPECIES	<i>A. caudatus e A. hybridus</i>

(Chagaray, 2005, p. 3)

Las especies más conocidas del género *Amaranthus* son: *caudatus*, *hypochondriacus*, *cruentus*, *hybridus*, *tricolor*, *blitum*, *dubius* y *virides* (Chagaray, 2005, pp. 3, 4).

1.1.3.3. Aspectos agroecológicos

El amaranto y el sangorache son especies anuales, que se cultivan en los valles de la Sierra Andina, en una altitud entre 2 000 y 3 000 m.s.n.m., en suelos francos bien drenados, con pH entre 6,0 – 7,5 y una preparación previa de arada, rastrada y surcada (Peralta et al., 2012, p. 56).

Para obtener plantaciones saludables se recomienda cultivar en zonas no propensas a heladas y en un rango de temperatura entre 15 y 24 °C, con precipitaciones entre 300 a 600 mm, por ciclo (Peralta et al., 2012, pp. 56, 57).

La siembra se realiza entre diciembre y enero, con una densidad de 12 kg/ha a chorro continuo y a 60 cm entre surcos. El ciclo de cultivo dura entre 150 y 180 días, la cosecha se realiza cuando el grano presenta cierta dureza, pero no se desprende aún de la panoja. También se pueden cosechar las hojas a los 80 días, para ser consumidas como hortalizas, siempre y cuando se hayan cuidado aspectos como el riego y la fertilización (Herrera y Montenegro, 2012, p. 55).

Los granos se almacenan en silos o sacos con un grado de humedad no mayor al 12 %, en sitios secos, ventilados y libres de plagas. Cuando se cosechan las hojas se consumen en fresco (Mujica et al., 1997, p. 43).

1.1.3.4. Composición química

El amaranto y el sangorache presentan porcentajes de proteína entre 12 y 19 %, estos valores son más altos en comparación al contenido proteico promedio (12 %), de otros cereales de uso común. Las proteínas de las semillas tienen un balance adecuado de lisina, metionina y triptófano (Herrera y Montenegro, 2012, p. 5; Mujica et al., 1997, p. 2).

El contenido de carbohidratos en las semillas varía entre 50 y 60 %, también contienen ácidos grasos principalmente oléico y linolénico. Los minerales de mayor abundancia son calcio, fósforo y potasio (Mujica et al., 1997, p. 2).

En la Tabla 1.2 se presenta la composición química de las semillas de amaranto y sangorache.

Tabla 1.2 Composición química de semillas de amaranto y sangorache

Componente*	Amaranto	Sangorache
Proteína (g)	12,00 - 19,00	11,00 - 14,00
Carbohidratos (g)	50,00 - 60,00	61,00 - 65,00
Lípidos (g)	6,10 - 8,10	6,00 - 7,00
Fibra (g)	3,50 - 5,00	7,50 - 8,50
Cenizas (g)	3,00 - 3,30	3,25 - 6,10
Calcio (mg)	130,00 - 164,00	154,00 - 285,00
Fósforo (mg)	455,00 - 530,00	247,00 - 385,00
Potasio (mg)	365,00 - 800,00	485,00 - 650,00
Vitamina C (mg)	1,50 - 4,00	2,50 - 6,30
Tiamina (mg)	0,07 - 0,25	0,13 - 0,45
Niacina (mg)	1,15 - 1,45	2,75 - 4,85
Riboflavina (mg)	0,19 - 0,29	0,21 - 0,35

*Para 100 g en base seca

(Chagaray, 2005, p. 12; Mujica et al., 1997, p. 79)

1.1.4. ARVEJA, CHOCHO y FREJOL

1.1.4.1. Origen

La arveja (*Pisum sativum L.*) es una leguminosa originaria de la cuenca mediterránea, su uso es amplio, desde hace mucho tiempo se consumen las semillas secas y, a partir del siglo XVI, también las tiernas. En Ecuador existen variedades mejoradas, con buenos rendimientos, como INIAP 431 (Andina),

INIAP-432 (Lojanita), INIAP-433 (Roxana), INIAP-434 (Esmeralda), INIAP-435 (Blanquita) e INIAP-436 (Liliana) (Peralta et al., 2010, p. 35).

El chocho (*Lupinus mutabilis*) y el fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) son leguminosas originarias de la región Andina, cultivadas por sus pobladores desde la antigüedad, y son uno de los principales aportantes de proteína en la dieta de las zonas rurales de la Sierra. Se han encontrado vestigios de estos productos en la tumbas de las culturas Nazca, Tiahuanaco e Inca (Peralta et al., 2010, p. 2).

1.1.4.2. Identificación taxonómica

En la Tabla 1.3 se presenta la identificación taxonómica de la arveja, el chocho y el fréjol.

Tabla 1.3 Identificación taxonómica de arveja, chocho y fréjol

	Arveja	Chocho	Fréjol
REINO	Plantae	Plantae	Plantae
DIVISIÓN	Angiospermae	Angiospermae	Angiospermae
CLASE	Dicotiledóneaceae	Dicotiledóneaceae	Dicotiledóneaceae
ORDEN	Rosales	Rosales	Rosales
FAMILIA	Leguminoceae	Leguminoceae	Leguminoceae
SUBFAMILIA	Vicioideae	Vicioideae	Phaseoloideae
TRIBU	Genisteae	Vicieae	Phaseoleae
GÉNERO	<i>Pisum</i>	<i>Lupinus</i>	<i>Phaseolus</i>
ESPECIE	<i>P. sativum</i>	<i>L. mutabilis</i>	<i>P. vulgaris</i>

(Sierra, 2005, p. 25)

1.1.4.3. Aspectos agroecológicos

La arveja, el chocho y el fréjol son leguminosas que forman parte de los sistemas de producción de la región Andina, se cultivan en asociación, intercalados, en monocultivos o en rotación con otros granos.

En la Tabla 1.4 se presenta un resumen de los aspectos agroecológicos de estas tres leguminosas.

Tabla 1.4 Aspectos agroecológicos de arveja, chocho y fréjol

Condiciones	Arveja	Chocho	Fréjol
Altitud (m.s.n.m.)	2 000 - 3 300	2 800 - 3 500	1 200 - 2 200
Suelos	Francos, arenosos pH: 6,5 - 7,0	Franco arenosos, arenosos pH: 5,5 - 7,0	Francos, arenosos pH: 5,5 - 7,5
Lluvia (mm)	300 - 400	300	300 - 700
Temperatura (°C)	12 - 18	7 - 14	16 - 20
Ciclo de cultivo (días)	115 - 135	180 - 240	110 - 115

(Peralta et al., 2010, pp. 2, 25, 34)

1.1.4.4. Composición química

La arveja, el chocho y el fréjol se caracterizan por su alto contenido de proteína (20 a 46 %, en base seca), lo que determina su importancia en la alimentación y en otras aplicaciones como abonos verdes.

En la Tabla 1.5 se presenta la composición química de semillas de arveja, chocho y fréjol.

Tabla 1.5 Composición química de las semillas de arveja, chocho y fréjol

Componente*	Arveja	Chocho	Fréjol
Proteína (g)	23,30	41,20	21,30
Carbohidratos (g)	60,10	29,40	64,60
Lípidos (g)	4,00	16,00	5,30
Fibra (g)	5,70	8,80	4,40
Calcio (mg)	70,00	90,00	106,00
Fósforo (mg)	303,00	455,00	429,00
Potasio (mg)	880,00	654,00	1 310,00
Sodio (mg)	42,00	32,00	2,00
Hierro (mg)	6,00	10,00	6,10
Vitamina A (mg)	8,67	0,00	3,33
Vitamina C (mg)	30,00	0,00	2,00

*Para 100 g, en base seca
(ANFAB, 2014, p. 1; FUNIBER, 2014, p. 1)

1.2. PROTEASAS

1.2.1. GENERALIDADES

Las reacciones químicas en los seres vivos, por lo general, se completan en milésimas de segundo o, quizá, en menos, bajo condiciones fisicoquímicas específicas. Los catalizadores biológicos son los responsables de esta elevada velocidad metabólica (Voet y Voet, 2006, p. 473).

Proteínas especializadas, denominadas enzimas, son catalizadores eficientes que hacen posible ejecutar reacciones complejas en condiciones fisiológicas preestablecidas. Sin estos catalizadores las reacciones serían muy lentas para realizar las actividades celulares necesarias que exige el ritmo metabólico (Lee, 1996, p. 34).

Büchner, en 1897, demostró que las enzimas extraídas de materia viva también funcionan en sistemas *in vitro*, separados de cualquier proceso vivo; con este descubrimiento se encontró un sinnúmero de aplicaciones bioquímicas y biotecnológicas para las enzimas y se despertó el interés por su estudio (Voet y Voet, 2006, p. 473).

Durante el siglo pasado se identificaron cerca de 1 500 enzimas con tamaños moleculares desde 10 000 a 500 000 Dalton (Da). La característica más importante de las enzimas es su capacidad de reconocer a uno o pocos sustratos, incluso en una mezcla compleja de ellos, así estos fueran isómeros ópticos. La estructura tridimensional bien definida que tienen las enzimas hace posible su especificidad (Voet y Voet, 2006, p. 473).

Las proteasas, también conocidas como enzimas proteolíticas, hidrolizan de manera específica los enlaces peptídicos de las proteínas. Son el grupo más grande y estudiado de las enzimas, debido a sus aplicaciones en la industria y la medicina, representan alrededor del 60 % en la comercialización de enzimas en todo el mundo (Feijoo y Villa, 2010, p. 1 066).

1.2.2. CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEASAS

La comisión sobre enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) estableció un esquema de clasificación para las enzimas, que consta de un número de cuatro dígitos y un nombre sintético terminado en “asa”. Se dividen en seis grandes grupos, según el tipo de reacción que catalizan:

1. Oxidorreductasas
2. Transferasas
3. Hidrolasas
4. Liasas
5. Isomerasas
6. Ligasas

Todas las enzimas pertenecen a uno u otro grupo de entre estos seis grupos, también conocidos como clase principal, y que corresponde al primer dígito de los cuatro asignados en la nomenclatura de las enzimas, el segundo y tercer dígitos corresponden a subclases y el último, a un número individual para cada enzima (Voet y Voet, 2006, p. 484).

Un ejemplo de esta nomenclatura se muestra a continuación con la tripsina. El número asignado a esta enzima es E.C. 3.4.21.4; el primer dígito (3) corresponde a la clase principal (hidrolasas); el segundo dígito (4) indica que forma parte del grupo de las peptidasas; el tercer dígito (2) indica que es una serinapeptidasa y el último dígito (1) corresponde al orden de agregación en la lista de enzimas serinapeptidasas (Gragera y Martínez, 2008, p. 552).

Las proteasas forman parte del grupo de las hidrolasas (E.C. 3). Actúan sobre enlaces peptídicos y dan como resultado péptidos más pequeños y aminoácidos libres. Según sus mecanismos catalíticos, se clasifican en cinco clases principales: aspártico, cisteína, metalo, serina y treoninaproteasas y, según el sitio donde hidrolizan al sustrato, se subdividen en exopeptidasas, que actúan en los extremos N- o C- terminales de las cadenas polipeptídicas, y en endopeptidasas, que hidrolizan los enlaces peptídicos intermedios (Ajamhassani et al., 2012, p. 368).

La clase aspárticoproteasas presenta dos residuos de ácido aspártico en el centro activo y el pH óptimo de actividad está entre 2 y 5, un ejemplo de estas proteasas es la pepsina. Las proteasas de tipo cisteína involucran, en la catálisis, un grupo tiol de un residuo de cisteína; para su activación se requieren agentes reductores como 2 mercaptoetanol y un pH óptimo entre 3 y 7, un ejemplo de esta clase de proteasas es la papaína. De igual manera, las serina y treoninaproteasas presentan residuos de aminoácidos serina y treonina en su centro activo, ejemplos de serinaproteasas son la tripsina y quimotripsina; mientras que, las metalo-proteasas requieren de iones metálicos divalentes en su centro activo, usualmente Zn, como las carboxipeptidasas (Ajamhassani et al., 2012, p. 368; Alvarado, 2012, p. 36).

Las proteasas, por lo general, se han asociado a la hidrólisis de proteínas en la digestión; sin embargo, se ha probado que tienen roles más complejos en un sinnúmero de actividades fisiológicas en el organismo, como reguladoras del ciclo y diferenciación celular, procesos de replicación viral, entre otros.

Algunas proteasas intervienen en el ciclo reproductivo de parásitos, como el de la malaria, al romper la membrana de eritrocitos infectados con merozoítos (etapa inicial del parásito) y permitir la liberación de estos, que a su vez, invaden a nuevos eritrocitos para repetir su ciclo reproductivo (Chassaing, 2001, p. 85).

La proteasa del VIH, interviene en la replicación del virus del VIH, al hidrolizar poliproteínas virales precursoras, que dan como resultado algunas proteínas que forman parte de la estructura propia del virus y otras que intervienen en el proceso de exportación hacia la nueva célula huésped (Soto, Gutiérrez y Seas, 2005, p. 1).

A continuación se presentan algunas características de proteasas representativas como tripsina, quimotripsina, papaína y carboxipeptidasa A.

1.2.2.1. Tripsina

La tripsina (E.C. 3.4.21.4) es una serinaproteasa, que se origina en el páncreas en forma inactiva como tripsinógeno, se segrega y es activada primero por enteropeptidasas de la mucosa duodenal y, luego, se activa en forma autocatalítica en el paso hacia el intestino delgado. La tripsina presenta una secuencia de 224 aminoácidos, su centro activo está formado por la triada histidina (57), serina (195) y aspartato (102) e hidroliza proteínas de manera específica en los residuos arginina y lisina. El peso molecular de la tripsina es 23,3 kDa. Las condiciones óptimas de desempeño están a temperaturas entre 36,5 y 37,5 °C y pH entre 7 y 8 (Voet y Voet, 2006, pp. 176, 545). En la Figura 1.1 se muestra un esquema del plegamiento tridimensional de la tripsina.

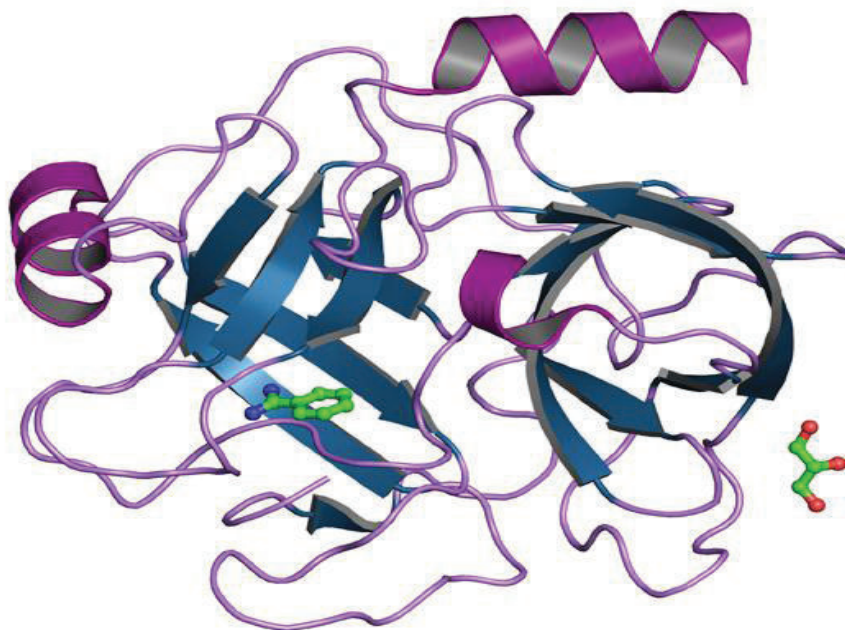


Figura 1.1 Modelo tridimensional de la tripsina
(MEROPS, 2014)

1.2.2.2. Quimotripsina

La quimotripsina (E.C. 3.4.21.1) también es una serinaproteasa de origen pancreático, que se sintetiza en forma inactiva como quimotripsinógeno. Se activa por hidrólisis específica con tripsina en los enlaces arginina (15) – isoleucina (16). La triada del centro activo de la quimotripsina es similar a la de la tripsina; sin embargo, es menos específica, actúa sobre el extremo C- terminal de aminoácidos aromáticos como fenilalanina, tirosina y triptófano. Está formada por 245 aminoácidos presentes en tres cadenas polipeptídicas, unidas por enlaces disulfuro. El peso molecular de la quimotripsina es 25,0 kDa (Voet y Voet, 2006, p. 545; Worthington, 2012). En la Figura 1.2 se muestra la disposición tridimensional y el centro activo de la quimotripsina.

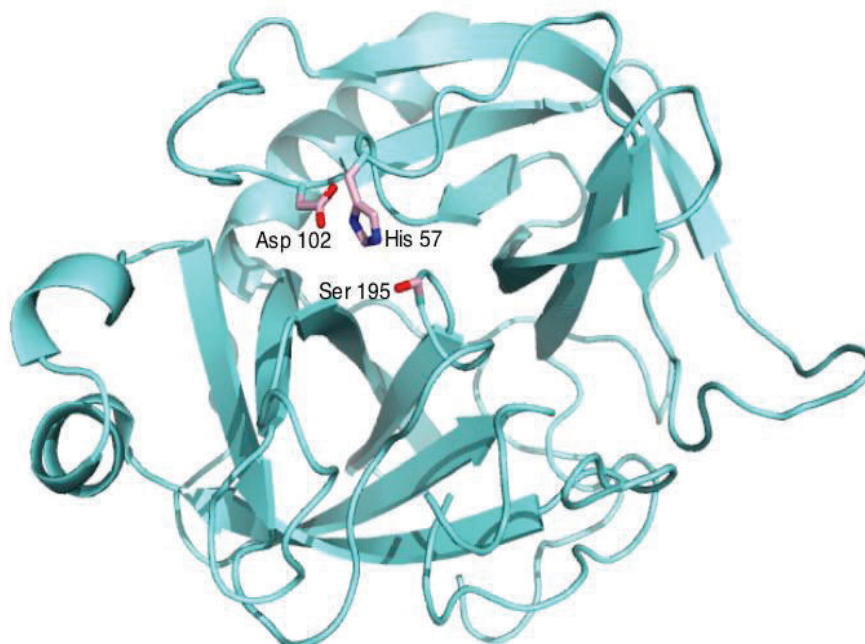


Figura 1.2 Modelo tridimensional de la quimotripsina
(MEROPS, 2014)

1.2.2.3. Papaína

La papaína (E.C. 3.4.22.2) es una cisteínaproteasa de origen vegetal, que hidroliza aminoácidos básicos como leucina, glicina y arginina. En estado natural su actividad es muy baja, por lo que son necesarios agentes reductores como 2-mercaptoetanol para maximizar su capacidad catalítica. La estabilidad de la papaína en solución está limitada por la presencia de agentes oxidantes, como iones de metales pesados e incluso el oxígeno atmosférico. El peso molecular de la papaína es 23,4 kDa. Las condiciones óptimas para la catálisis se obtienen a temperaturas entre 35 y 65 °C y pH entre 3 y 7 (Worthington, 2012). En la Figura 1.3 se muestra la estructura tridimensional y el centro activo de la papaína.

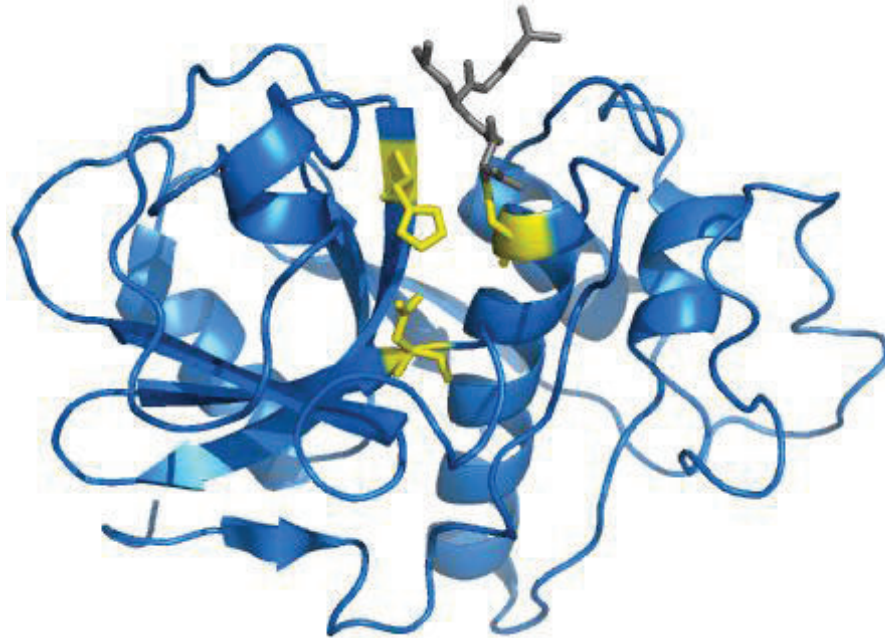


Figura 1.3 Modelo tridimensional de la papaína y representación de su centro activo (Feijoo y Villa, 2010, p. 1 068).

1.2.2.4. Carboxipeptidasa A

La carboxipeptidasa A (E.C. 3.4.17.1) es una metaloproteasa que actúa sobre el extremo C- terminal de un polipéptido o proteína. Al igual que la tripsina y la quimotripsina, es de origen pancreático, por tal razón también se la conoce como exopeptidasa pancreática (CPA-1). Posee un ion de zinc en el centro activo, que puede ser desplazado fácilmente por otro metal divalente, esta alteración puede provocar la pérdida total de actividad. La carboxipeptidasa A presenta una secuencia sencilla de 307 aminoácidos y un peso molecular de 34,4 kDa (Fersht, 1998, pp. 314-317). En la Figura 1.4 se muestra un esquema del plegamiento tridimensional de la carboxipeptidasa A.

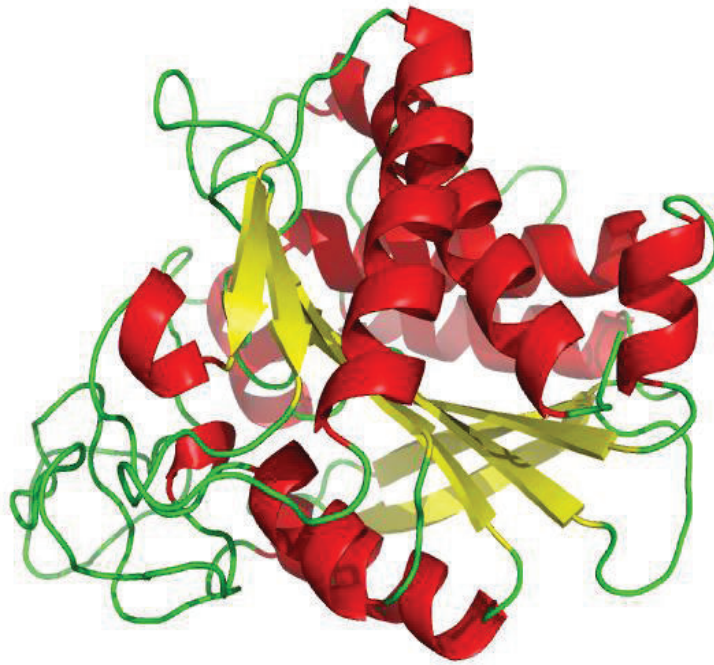


Figura 1.4 Modelo tridimensional de la carboxipeptidasa A
(MEROPS, 2014)

1.2.3. INHIBIDORES DE PROTEASAS

1.2.3.1. Generalidades

Toda sustancia que reduce la actividad enzimática se puede llamar inhibidor. Existen inhibidores como los taninos polifenólicos, que se unen a las enzimas para limitar su actividad de manera poco específica; mientras que, otros inhibidores de carácter proteico pueden inhibir enzimas de forma muy especializada. La inhibición puede ser reversible, si la enzima recupera su actividad catalítica por completo, luego de la acción del agente inhibidor, o irreversible, si la enzima se afecta de tal forma que ya no puede recuperar su actividad (Morales y Troncoso, 2012, p. 239).

Las proteínas que actúan como inhibidores enzimáticos presentan algunas funciones importantes en los organismos vivos, como reguladores de la actividad celular o como mecanismos de defensa (Vera, 2007, p. 409).

Los inhibidores de proteasas (IPs) son proteínas solubles, de bajo peso molecular, en su mayoría termoestables, de origen animal o vegetal, su estudio es de gran importancia, ya que las enzimas que inhiben pueden estar involucradas en procesos como la digestión, la diferenciación celular, la defensa inmunológica, la apoptosis, la cicatrización de heridas, entre otros.

Los IPs de origen vegetal se encuentran, en su mayoría, en las hojas y semillas, como mecanismo de defensa que al ser ingeridos provocan dificultades digestivas, razón por la cual también se los conoce como factores antinutricionales; no obstante, se han descubierto aplicaciones importantes en la biotecnología, biomedicina y en el diagnóstico o terapéutica de enfermedades como el cáncer, el Alzheimer; desórdenes inmunológicos; infecciones parasitarias, fúngicas y virales, como la malaria, el VIH y la hepatitis; entre otras (Conlan, 2000, p. 1; García et al., 2009, p. 76).

Read y Hass (1930) identificaron actividad inhibidora de tripsina en un extracto de soya (*Glycine max*), luego Kunit (1946) aisló un inhibidor con el mismo efecto. Las leguminosas son la principal fuente vegetal de inhibidores de proteasas; aunque, también se han encontrado en cereales y muestras animales. Los estudios se han realizado en su mayoría sobre la inhibición de tripsina, por ser una de las principales proteasas digestivas (Morales y Troncoso, 2012, p. 239). Las investigaciones actuales sobre IPs se han direccionado, especialmente, a la farmacología, con descubrimientos como el antihipertensivo captopril que derivó en enalaprilato y luego en el fármaco comercial conocido como enalapril (Avendaño, 2009, pp. 59, 63).

A mediados del siglo XX se iniciaron una serie de estudios sobre IPs, con el afán de aprovechar sus características y usarlos como fármacos, frente a enfermedades como el cáncer, en la década de los 70, y el VIH, a partir de los 80 (Conlan, 2000, p. 1).

1.2.3.2. Inhibidores de proteasas en plantas

A lo largo de la evolución, las plantas han desarrollado mecanismos de defensa contra el ataque de factores bióticos como plagas y enfermedades o abióticos como sequías e inundaciones. La estrategia de defensa se basa en adaptaciones estructurales, generación de sustancias químicas o modificaciones metabólicas, todas influenciadas por el entorno, que obligan a desarrollar características específicas para la sobrevivencia (Blanco y Aguirre, 2002, p. 3).

Los IPs son una respuesta química que las plantas generan contra el ataque de plagas, están preformados o pueden sintetizarse, de manera inducida, luego del ataque del patógeno. Estas reacciones de defensa son complejas y específicas, de tal manera que la diversidad bioquímica de las mismas es muy amplia. Los mecanismos de defensa que desarrolla una planta son únicos (Blanco y Aguirre, 2002, p. 3; Vivanco, Cosío, Loyola y Flores, 2005, p. 68).

Los IPs interfieren con los procesos digestivos de los insectos que consumen alguna parte de la planta, al dificultar la actividad de sus proteasas digestivas y, por consiguiente, la adecuada absorción de aminoácidos esenciales. Esta alteración provoca disminución en el crecimiento y desarrollo de las plagas. Otros estudios reportan efectos adversos como baja absorción de nitrógeno y agrandamiento del páncreas (Habib, 2007, p. 70).

Las semillas son la principal fuente de IPs en las plantas. Varios estudios identificaron inhibidores de tripsina, quimotripsina y carboxipeptidasa, en semillas de *Glycine max*, *Hordeum vulgare*, *Solanum tuberosum*, *Triticum aestivum*, *Zea mays*, entre otras fuentes. Aunque en menor proporción, también se han encontrado IPs en otras partes de las plantas como hojas, tallos y raíces (Habib, 2007, p. 71).

1.2.3.3. Clasificación de los IPs

Los IPs se pueden clasificar por su mecanismo de acción o por la proteasa que inhiben. La base de datos MEROPS (clasificación de peptidasas e inhibidores) divide a los IPs en 85 familias y 26 subfamilias o clanes, de acuerdo con algunas características que determinan el mecanismo de acción, como la secuencia de aminoácidos, pliegues y dominios de la cadena polipeptídica (Rawlings, 2008).

Los IPs también se pueden clasificar según el tipo de proteasa que inhiben, en inhibidores de cisteína, serina, metalo, treonina y aspárticoproteasas, este agrupamiento es más general; sin embargo, los inhibidores de serinaproteasas son el grupo más estudiado, por su actividad sobre tripsina y subtilisina, la primera que se encuentra en microorganismos, plantas y animales; y, la segunda, en bacterias (Rawlings, 2008).

1.2.3.4. Caracterización de los IPs

Luego del proceso de obtención de un inhibidor es importante determinar características básicas de la biomolécula, como su peso molecular, tipo de inhibición y la dosis inhibitoria media (IC_{50}).

a) Determinación del peso molecular: El peso molecular puede ser determinado mediante electroforesis, que consiste en la movilidad de una partícula cargada a través de un medio de dispersión, por la influencia de un campo eléctrico. La velocidad de migración es directamente proporcional a la diferencia de potencial, y a la carga neta de la partícula, e inversamente proporcional a la resistencia del medio de dispersión. Este principio también se aplica para determinar el punto isoeléctrico, grado de pureza, verificación de la estrategia de obtención y concentración de la muestra (Voet y Voet, 2006, p. 156).

La electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE es la técnica más común para determinar pesos moleculares de biomoléculas. La poliacrilamida es un

soporte inerte, transparente, de propiedades uniformes, y de fácil preparación según los requerimientos de la muestra a analizar (Voet y Voet, 2006, p. 156).

La concentración de poliacrilamida en los geles depende del peso aproximado que tenga la muestra. Para determinar pesos moleculares bajos (menores a 10 kDa), se requieren geles con porcentajes de poliacrilamida entre 15 y 20 %; mientras que, para moléculas con pesos elevados (mayores a 50 kDa), es necesario preparar geles que contengan 7,5 % o menos (Lomonte, 2002, p. 95).

Las muestras a analizar se desnaturalizan previamente, con reactivos como 2-mercaptoetanol y dodecil sulfato de sodio (SDS). Este último, por ser anfipático, además confiere carga a las proteínas, característica importante para la correcta movilidad, puesto que si las proteínas se acercan al punto isoelectrico no migrarán (Lomonte, 2002, p. 95).

Durante la corrida electroforética, las proteínas de mayor peso molecular migran lentamente y se depositan en la parte superior del gel; mientras que, las pequeñas avanzan más rápido y se ubican en la parte inferior del gel. Bajo esta lógica, las proteínas se distribuyen a lo largo del gel de acuerdo con su peso molecular (García, 2000, p. 36).

Luego de la corrida electroforética los geles se fijan, tiñen y decoloran en soluciones que contienen ácido acético glacial y etanol. El proceso de teñido se realiza con azul de bromofenol, azul de Coomassie o con nitrato de plata, si la concentración de proteína es baja. Para la determinación del peso molecular es necesario correr en uno de los carriles una solución estándar (mezcla de proteínas de peso molecular conocido) que servirá como referencia, para el correspondiente análisis comparativo (Lomonte, 2002, p. 95).

Otra técnica para determinar el peso molecular de proteínas es la espectrometría de masas (MALDI TOF), que consiste en ionizar la muestra, en fase gaseosa, a través de un campo eléctrico de alto voltaje (70 eV). A continuación, las moléculas cargadas pasan por un sistema de aceleración que aumenta su energía cinética,

luego atraviesan un campo magnético variable que curva su trayectoria de acuerdo con su carga y masa. Las moléculas chocan contra un detector que los contabiliza y envía la información a un ordenador para que grafique el número de colisiones (abundancia relativa) versus la masa dividida para la carga (Hoftman y Stroobant, 2007, pp. 1, 3 y 5).

Esta técnica es de mayor sensibilidad que la electroforesis, presenta un espectro a detalle de cada molécula, incluso en concentraciones en el orden de ppb; sin embargo, en la fase de ionización las partículas pueden fragmentarse y generar picos adicionales en el espectrograma (Hoftman y Stroobant, 2007, p. 1).

b) Tipo de inhibición e IC_{50} : Por otra parte, también es muy importante identificar el tipo de inhibición que genera la biomolécula en estudio. La bibliografía especializada, por lo general, identifica tres tipos de inhibición: competitiva, no competitiva y mixta.

La inhibición competitiva hace referencia a la competición que existe entre el sustrato y el inhibidor por el centro activo de la enzima. Este tipo de inhibición se limita por la concentración de sustrato. En la inhibición no competitiva, la molécula inhibidora se une con la enzima en un lugar diferente al centro activo, el mismo que se distorsiona por la acción del inhibidor, así la enzima pierde su actividad sobre el sustrato. Por último, en la inhibición de tipo mixto, el inhibidor se une a la enzima cuando está libre o ya se ha formado el complejo enzima-sustrato, y su acción limita la formación del producto (Nelson y Cox, 2009, p. 207).

Para identificar el tipo de inhibición se requiere de un estudio cinético que determine la variación de las constantes cinéticas K_m y $V_{m\acute{a}x}$ en presencia y ausencia de la sustancia inhibidora. El comportamiento de las reacciones catalizadas por enzimas fue determinado por Michaelis-Menten, en un modelo sencillo que involucra al sustrato, la enzima, el complejo enzima-sustrato y el producto.

Michaelis-Menten también analizaron el cambio de la velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato y establecieron el valor de K_m como la concentración de sustrato requerida para alcanzar la mitad de la velocidad máxima de reacción (Voet y Voet, 2006, p. 493).

La ecuación que rige el modelo de Michaelis-Menten fue linealizada por Hans Lineweaver y Dean Burk mediante sus inversos. Esta modificación algebraica facilita la determinación de K_m y $V_{m\acute{a}x}$, que al graficar, el valor de corte con el eje de las ordenadas corresponde al inverso de la $V_{m\acute{a}x}$; y la pendiente corresponde al coeficiente entre K_m y $V_{m\acute{a}x}$ (Nelson y Cox, 2009, p. 208).

En la Tabla 1.6 se muestran las variaciones que experimentan las constantes cinéticas K_m y $V_{m\acute{a}x}$, de acuerdo con el tipo de inhibición.

Tabla 1.6 Variación de las constantes cinéticas K_m y $V_{m\acute{a}x}$ según el tipo de inhibición

Tipo de inhibición	Constantes cinéticas	
	K_m	$V_{m\acute{a}x}$
Competitiva	Aumenta	Constante
No competitiva	Constante	Disminuye
Mixta	Aumenta	Disminuye

(Voet y Voet, 2006, pp. 501, 502)

En la Figura 1.5 se ilustran las gráficas de los dobles recíprocos de los tres tipos de inhibición competitiva, no competitiva y mixta

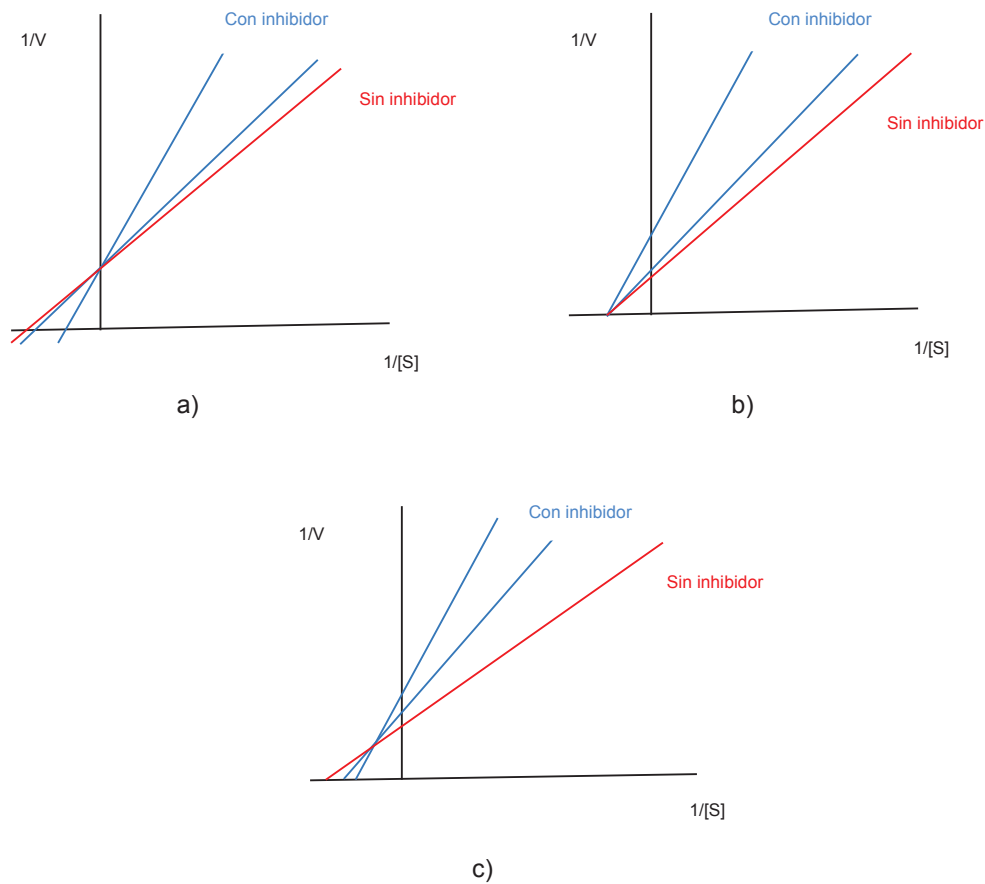


Figura 1.5 Representaciones graficas de los dobles recíprocos a) inhibición competitiva, b) inhibición no competitiva, c) inhibición mixta (Voet y Voet, 2006, pp. 501, 502)

Las variaciones que experimentan las constantes cinéticas dependen del tipo de inhibición y se modifican por un factor α o α' que cambia su denominación a $V_{\text{máx}}$ aparente o K_m aparente, como se muestra en la Tabla 1.7.

Tabla 1.7 Variación de K_m y $V_{\text{máx}}$ según el tipo de inhibición

Tipo de inhibición	K_m aparente	$V_{\text{máx}}$ aparente
Sin inhibidor	K_m	$V_{\text{máx}}$
Competitiva	αK_m	$V_{\text{máx}}$
No competitiva	$\frac{K_m}{\alpha'}$	$\frac{V_{\text{máx}}}{\alpha}$
Mixta	$\frac{\alpha K_m}{\alpha'}$	$\frac{V_{\text{máx}}}{\alpha'}$

(Nelson y Cox, 2009, p. 210)

La constante de inhibición K_i representa el grado de afinidad que tienen el inhibidor y la enzima. El valor de K_i se calcula mediante la relación entre el factor α o α' y la concentración del inhibidor, según la Ecuación 1.1.

$$\alpha = \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \quad [1.1]$$

Por otra parte, se define al IC_{50} como la concentración de una solución inhibidora requerida para disminuir la actividad enzimática a la mitad. Copeland et al., (2005), determinan el valor de IC_{50} como el valor de K_i en soluciones con actividad enzimática parcialmente purificadas (p. 1 948).

1.2.3.5. Aplicaciones de los inhibidores de proteasas

Los IPs están involucrados en todos los niveles de organización de la vida. Una célula no sobreviviría mucho tiempo sin la acción reguladora de los IPs. A partir de su descubrimiento, se han realizado estudios sobre varias fuentes de inhibidores y sus posibles aplicaciones en la agricultura, biotecnología y en especial en la medicina (Avendaño, 2009, p. 59).

Las investigaciones desarrolladas por Kunitz (1946) dieron inicio al desarrollo de métodos de obtención y el análisis de numerosas fuentes de IPs. En la década de los 70, Cushman y Ondetti obtuvieron el captopril, un fármaco para regular la hipertensión que es un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina I, cuya estructura es similar a la carboxipeptidasa A (Avendaño, 2009, p. 63).

En la década de los 80, las investigaciones académicas e industriales se centraron en identificar inhibidores de la enzima transcriptasa inversa, que es la responsable de la replicación viral del VIH. La constante mutación del virus ocasionada por el proceso normal de su reproducción, dificultó encontrar un solo inhibidor capaz de detener el ataque viral, así es que la comunidad científica optó por usar un “coctel” de inhibidores. En 1996 se presentó un estudio que

demuestra que pacientes infectados con VIH y tratados con una mezcla de IPs, redujeron la cantidad del virus en la sangre a niveles indetectables (Conlan, 2000, p. 4).

Estudios más recientes demuestran que los IPs suministrados contra el VIH también disminuyen en un 40 % el riesgo de recurrencia de malaria en pacientes infectados con este virus.

En la Tabla 1.8 se muestran algunos inhibidores de proteasas y sus nombres comerciales, así como la fecha de su aprobación por la FDA.

Tabla 1.8 Inhibidores comerciales y su aprobación por la FDA

Inhibidor de proteasa	Nombre comercial	Fecha de aprobación
Saquinavir	Invirase	Diciembre, 1995
Ritonavir	Norvir	Marzo, 1996
Indinavir	Crixivan	Marzo, 1996
Nelfinavir	Viracept	Marzo, 1997
Saquinavir	Fortovase	Noviembre, 1997
Amprenavir	Agenerase	Abril, 1999
Lopinavir/Ritonavir	Kaletra	Septiembre, 2000
Atazanavir	Reyataz	Junio, 2003
Fosamprenavir	Lexiva	Octubre, 2003
Etravirina	Intelence	Enero, 2008
Rilpivirina	Edurant	Mayo, 2011
Abacavir, dolutegravir y lamivudina	Triumeq	Agosto, 2014

(FDA, 2014)

Los inhibidores de proteasas que se muestran en la Tabla 1.8 actúan sobre la proteasa del VIH, que es una enzima compuesta de dos cadenas poliproteínicas idénticas unidas de forma no covalente, que actúa sobre dos proteínas precursoras de la replicación viral (Soto, Gutiérrez y Seas, 2005, p. 1)

Otras aplicaciones importantes que tienen los IPs se han desarrollado en la agricultura, como una alternativa al uso de pesticidas tradicionales que, al no ser específicos, causan daños a organismos superiores (Blanco y Aguirre, 2002, p. 1).

Molina (2010, p. 17) obtuvo un inhibidor de aspártico proteasas de *Hypothenemus hampei* (broca del café), los ensayos se realizaron con semillas de *Lupinus bogotensis*, *Amaranthus hypochondriacus*, *Phaseolus acutifolius*, *Phaseolus coccineus*, entre otros. La mayor actividad inhibidora la encontró con el extracto de *L. bogotensis*.

1.3. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS A ESCALA PILOTO

1.3.1. GENERALIDADES

La estrategia para la purificación de proteínas depende del uso posterior que tendrá la biomolécula; si es para investigación, es necesario priorizar su pureza sobre el rendimiento o, si el fin es industrial, es importante tener altos rendimientos a bajo costo; sin embargo, para usos terapéuticos, la pureza y el rendimiento son importantes. Otros factores como la fuente de la proteína, su ubicación intra o extracelular, su estado (nativa o desnaturalizada), entre otros, determinarán las etapas en el proceso de extracción (Voet y Voet, 2006, p. 136).

En la purificación se pueden establecer algunos procedimientos generales; primero, se define un ensayo específico que identifique la actividad biológica de la proteína, para luego de cada etapa de purificación determinar los porcentajes de rendimiento y verificar, si en efecto, se purificó. Luego se elige la matriz biológica adecuada, se extrae el grupo proteínico de la fuente, se aísla la proteína de interés, se concentra, estabiliza y, finalmente, se caracteriza la biomolécula (Álvarez, 2005, p. 4).

El desarrollo de un producto comercial se basa en la experimentación a escala de laboratorio, cuando los resultados son favorables, se plantea un escalamiento

progresivo hasta su producción industrial. Para escalar un proceso se pueden seguir dos mecanismos que se ejemplifican en el esquema de la Figura 1.6.

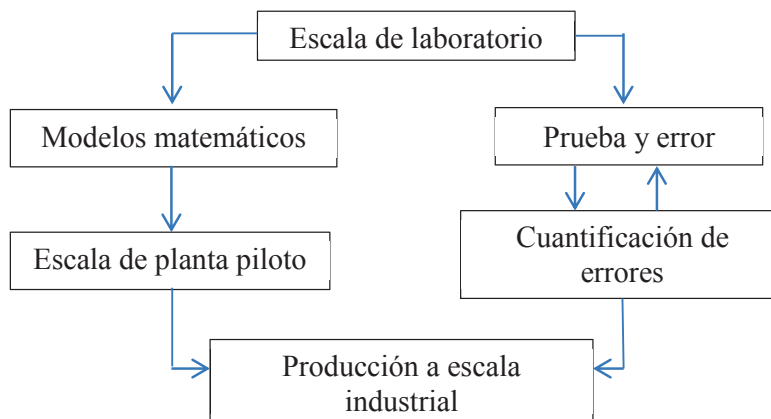


Figura 1.6 Procedimientos para escalar desde laboratorio a producción industrial
(Anaya y Pedraza, 2008, p.33)

Escalar los procesos mediante una planta piloto disminuye costos y establece un mecanismo más seguro en la inversión, que se requiere para poner en marcha un proceso productivo (Anaya y Pedraza, 2008, p. 33).

1.3.2. MÉTODOS DE PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La purificación de proteínas es una tarea compleja, dado que las fuentes contienen sustancias diferentes con similares características. Generalmente, la cantidad de proteína de interés corresponde a un porcentaje mínimo del peso seco de la fuente y que, a menudo, se desea llevar a puridades mayores al 90 %. Los métodos de purificación de proteínas se basan en propiedades como tamaño molecular, solubilidad, carga iónica, polaridad y afinidad (Voet y Voet, 2006, p. 135; Vita, 2014, p. 1).

Los procedimientos que se pueden adoptar para la purificación de proteínas, de acuerdo con sus propiedades, se muestran en la Tabla 1.9.

Tabla 1.9 Métodos de purificación de proteínas

Propiedades	Procedimientos
Tamaño molecular	<ul style="list-style-type: none"> - Diálisis - Electroforesis en gel - Cromatografía de exclusión molecular - Ultrafiltración centrífuga
Solubilidad	<ul style="list-style-type: none"> - Precipitación con sales - Precipitación con solventes orgánicos - Precipitación por pH - Tratamiento térmico
Carga iónica	<ul style="list-style-type: none"> - Cromatografía de intercambio iónico - Electroforesis - Isoelectroenfoque
Polaridad	<ul style="list-style-type: none"> - Cromatografía de absorción - Cromatografía en papel - Cromatografía en fase reversa - Cromatografía de interacción hidrofóbica
Afinidad	<ul style="list-style-type: none"> - Cromatografía de afinidad

(Voet y Voet, 2006, p. 139)

Para purificar una proteína es necesario aplicar una serie de procedimientos independientes, consecutivos, que aprovechen sus propiedades fisicoquímicas. También es importante establecer uno o varios ensayos para medir la actividad biológica y así cuantificar el grado de purificación luego de cada procedimiento (Vita, 2014, p. 8).

1.3.2.1. Cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular, también conocida como filtración en gel, se fundamenta en la separación de moléculas por su tamaño. El proceso cromatográfico consta de dos fases; una móvil, que es la solución a fraccionar y una fase fija o estacionaria, que es una matriz sólida formada por microesferas porosas (Voet y Voet, 2006, p. 144).

Las moléculas de mayor tamaño no ingresan a los poros de la matriz y pasan primero; mientras que, las moléculas pequeñas siguen una ruta más sinuosa que retarda su paso. En las fracciones cromatográficas las moléculas se ordenan por su tamaño de mayor a menor. Con esta técnica también se puede estimar la masa molecular, de acuerdo con el volumen relativo de elución (Fagáin, 2013, p. 2). En la Figura 1.7 se ilustra esta distribución molecular.

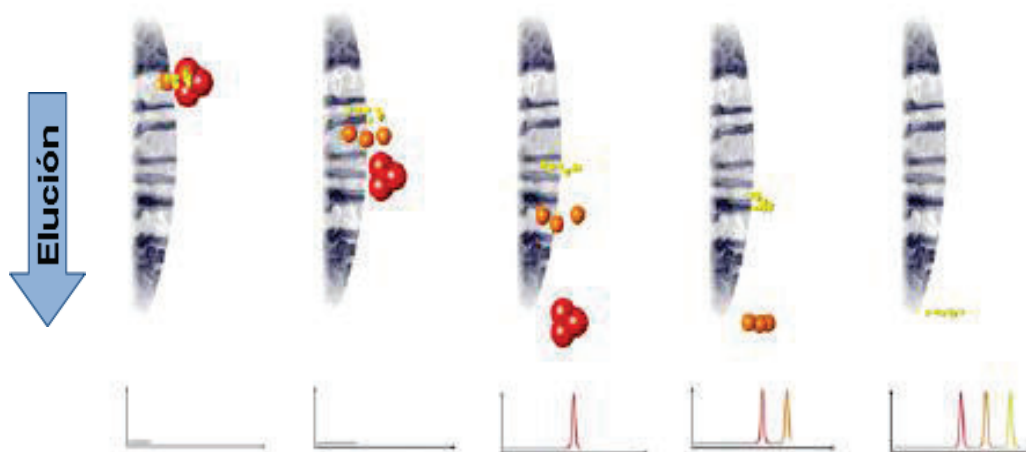


Figura 1.7 Representación esquemática de la cromatografía de exclusión molecular (Vita, 2014, p. 4)

1.3.2.2. Ultrafiltración centrífuga

La técnica de ultrafiltración centrífuga se basa en la separación a través de membranas semipermeables, de tamaño de poro conocido. Esta técnica se usa tanto para fraccionamiento como para concentración de proteínas. El fraccionamiento de la solución proteica se produce por centrifugación a velocidades entre 2 000 y 10 000 $\times g$. Según las especificaciones de poro de la membrana, las proteínas de mayor tamaño forman el retenido; mientras que, las proteínas de menor o igual tamaño, el permeado (Almécija, 2007, p. 56).

El fraccionamiento también depende del pH y de la fuerza iónica de las muestras, puesto que las proteínas presentan diferencias en su estructura tridimensional a diferentes valores de pH y fuerza iónica; es así que, a distintos valores de pH, una

misma proteína puede estar en el retenido o en el permeado (Almécija, 2007, p. 125).

La ultrafiltración centrífuga es una técnica que no contamina ni diluye las muestras, a diferencia de otros métodos, como la precipitación con sales o solventes orgánicos. Sin embargo, es necesario tomar en cuenta variables como el pH, la fuerza iónica o las interacciones proteína-proteína y proteína-membrana (Havlíček y Novák, 2013, p. 88).

La ultrafiltración también se puede aplicar de forma tangencial; es decir, el fluido a filtrar recircula tangencialmente sobre la superficie de la membrana, mediante presión. Así se evita la colmatación de la membrana y se permite su reutilización en el proceso. Esta técnica es fácilmente escalable desde laboratorio hasta una planta de producción industrial (Almécija, 2007, p. 56).

1.3.2.3. Precipitación con solventes orgánicos

La adición de un solvente orgánico, miscible en agua, a la solución proteica provoca la precipitación de proteínas de acuerdo con la concentración final del solvente en la mezcla (Sigma-Aldrich, 2006, p. 1).

El principal efecto para la precipitación es la disminución en la actividad de agua en la solución, el agua se inmoviliza al hidratar al solvente, así la solubilización de las proteínas disminuye hasta que se agregan y consecuentemente precipitan (Primo, 2005, p. 990).

Los solventes a utilizar, para la purificación de proteínas, deben ser completamente miscibles en agua, no reaccionar con la proteína y tener un buen efecto precipitante. Los solventes más utilizados son la acetona, etanol, metanol, TCA, entre otros (Primo, 2007, p. 990).

Para la precipitación, la temperatura debe ser menor a 10 °C, para evitar la desnaturalización de las proteínas provocada por el solvente al interactuar con la estructura proteica, que es más flexible cuanto más alta es la temperatura. Solventes como los alcoholes de cadena larga provocan este fenómeno con más frecuencia (Primo, 2007, p. 990).

1.3.2.4. Tratamiento térmico

La estabilidad térmica de algunas proteínas es una propiedad que facilita su purificación. No es posible generalizar sobre la termoestabilidad de las proteínas, en consecuencia, es posible purificar aquellas que presentan mayor estabilidad a altas temperaturas, como los inhibidores de proteasas que son estables a temperaturas entre 60 a 80 °C, durante 30 min (Brenes y Brenes, 1993, p. 10).

La temperatura y el pH no son independientes en la precipitación de proteínas, ya que la temperatura de desnaturalización depende del pH de la solución (Voet y Voet, 2006, p. 137).

1.3.2.5. Cromatografía de afinidad

La cromatografía de afinidad es una de las técnicas de mayor poder resolutivo debido a la capacidad que tienen las proteínas para unirse de manera altamente selectiva y reversible a otra biomolécula.

El procedimiento consiste en inmovilizar químicamente una biomolécula (ligando) a una matriz inerte de manera covalente. La matriz corresponde a la fase fija o estacionaria de la cromatografía. La solución que contiene la proteína de interés, o fase móvil, pasa a través de la matriz, en donde dicha proteína se liga de manera específica a la molécula inmovilizada. Las impurezas son eluidas de la columna por arrastre con un tampón. Para recuperar la proteína de interés se modifican las condiciones cromatográficas, como el pH o también se puede pasar

a través de la matriz otra biomolécula con mayor afinidad por el ligando (Voet y Voet, 2006, p. 148). En la Figura 1.3 se esquematiza la cromatografía por afinidad.

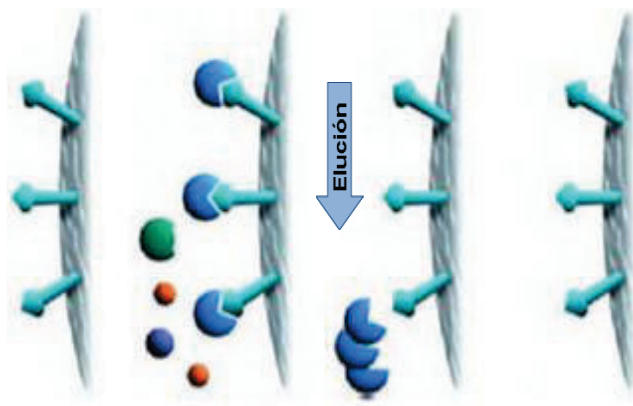


Figura 1.8 Representación esquemática de la cromatografía de afinidad
(Acikara, 2013, p. 3)

1.3.3. PRODUCCIÓN DE BIOMOLÉCULAS A ESCALA PILOTO

La producción a escala piloto se define como un nivel de producción intermedio entre el laboratorio y la producción industrial. Está compuesta de un conjunto de procesos que funcionan como un todo, para fabricar en serie un producto que fue definido en el laboratorio y que tiene perspectivas industriales (Anaya y Pedraza, 2008, p. 32).

La escala piloto también puede tener otros objetivos en la producción; para probar la aceptabilidad de un producto en el mercado; o, definir algunas variables de un proceso específico, que no pueden ser determinadas en el laboratorio (Quijano, 1995, p. 107).

Para desarrollar un proyecto de diseño de plantas sea a escala piloto o industrial, se definen una metodología y un esquema que organiza las etapas del diseño. Existen varios métodos, pero todos coinciden en dividir al diseño en tres paquetes de ingeniería: conceptual, básica y detalle (Bernal, 2005, p. 22).

1.3.3.1. Ingeniería conceptual

En la ingeniería conceptual se plantea el problema, se buscan y analizan principios y conceptos que contribuyan con la solución, se identifican las restricciones, se valoran las propuestas y se conceptualizan las ideas que se materializarán en las siguientes etapas (Bernal, 2005, p. 22).

La primera fase de la ingeniería conceptual es la definición del producto, que incluye propiedades físicas como la presentación, tamaño, tipo de empaque, aspecto en general y propiedades químicas como grado de pureza, componentes, entre otros, que tendrá el producto. Sin embargo, todas estas variables pueden modificarse con la fase de estudio de mercado, que sirve para identificar el potencial grupo consumidor, sus requerimientos y preferencias con respecto al producto, así como también las ventajas que se pueden ofertar sobre la competencia, si la hubiere (Miranda, 2004, p. 279).

Cuando se ha definido el producto se analizan las alternativas tecnológicas. Esta fase contempla la factibilidad tecnológica de cada operación unitaria y sus condiciones de trabajo como: tiempo, presión, temperatura, etc. Algunos procesos o líneas de producción se pueden llevar a cabo con diferentes equipos, esta flexibilidad permite escoger una alternativa tecnológica, más bien, en función de intereses económicos o de facilidad de operación; no obstante, las condiciones de operación de los equipos no siempre se detallan en catálogos o fuentes bibliográficas y es necesario utilizar programas de simulación o realizar pruebas preliminares a escala de laboratorio, para definir la mayor cantidad de variables (Bernal, 2005, p. 23).

Las características de la materia prima e insumos también influyen en la elección de las alternativas tecnológicas, porque depende de las propiedades físicas, químicas, condiciones de almacenamiento o procesamiento previo que pueden requerir (Casp, 2005, p. 31).

En la etapa de conceptualización también se identifican y describen los servicios industriales. Este término hace referencia a fluidos de calentamiento, enfriamiento, combustible, agua y energía eléctrica, requeridos en algún proceso, pero que no forman parte del producto a elaborar (Bernal, 2005, p. 24; Casp, 2005, p. 33).

La capacidad de la planta se define por el estudio de mercado y la proyección de crecimiento de las ventas.

La localización geográfica de la planta depende de factores como disponibilidad de materia prima, facilidad de transporte, ubicación de mercado, suministro de agua y energía, restricciones legales, entre otros. Si existe más de una alternativa viable para ubicar la planta, es recomendable usar una matriz de decisión que cuantifique los factores ponderados de acuerdo con el grado de importancia. La localización de la planta tendrá influencia directa en el éxito o fracaso del proyecto (Bernal, 2005, p. 26).

1.3.3.2. Ingeniería básica

El diseño de la ingeniería básica es un estudio de pre-factibilidad técnico que analiza las operaciones unitarias del proceso, la selección y secuencia lógica de los equipos, para establecer las bases de la ingeniería de detalle. Esta etapa comienza con la descripción del alcance del proyecto para definir las actividades a realizar, también se identifican los estándares, normas técnicas y sistema de unidades a utilizar (Casp, 2005, p. 35).

a) Balances de masa y energía, una vez que se ha seleccionado la alternativa tecnológica y definido la capacidad de producción de la planta, se realizan los balances de masa y energía para cuantificar los requerimientos de materia prima, insumos y servicios industriales, también se determinará la cantidad de residuos y desechos que se generan. Para desarrollar los balances de masa y energía es necesario que se hayan definido las condiciones de operación en cada proceso,

mediante simulación, revisión bibliográfica o pruebas preliminares (Smith, 2005, p. 5).

Los balances de masa y energía sirven también para calcular el espacio físico de la planta y establecer el flujo de materia prima, productos intermedios y terminados. Mientras menos supuestos se planteen en los requerimientos de masa y energía, menor será la diferencia entre los valores calculados y los reales (Smith, 2005, p. 5).

b) Diagramas de proceso, la secuencia de las operaciones y equipos se pueden representar a través de diagramas de proceso, que son una herramienta de lenguaje en la ingeniería y que enlazan y muestran las corrientes de entrada y salida en cada operación unitaria. Los diagramas más comunes en el diseño de plantas son:

- Diagrama de bloques (BFD), muestra una abstracción de las operaciones unitarias en forma de bloques interconectados en la dirección del flujo del proceso, sin hacer referencia a equipos específicos.
- Diagrama de flujo (PFD), esquematiza los equipos de las líneas principales y auxiliares de la producción, muestra información relevante de las corrientes. En una tabla complementaria se indican a detalle las propiedades y lo que transporta cada corriente.
- Diagrama de instrumentación y tuberías (P&ID), detalla válvulas, bombas, tuberías y accesorios de la planta.
- Planimetrías del área de producción y planta completa (LAY OUT), detalla la distribución de los equipos en el área de producción y la distribución de las áreas dentro de la planta.

Los diagramas BFD, PFD y LAY OUT son herramientas de la ingeniería básica; mientras que, el diagrama P&ID se utiliza en la ingeniería de detalle (Walker, 2009, pp. 15-17).

c) Selección de equipos, con los resultados del balance de masa, se determina la capacidad de los equipos, a este valor se agregan dos adicionales, uno de acuerdo con la proyección de crecimiento de la planta y otro de seguridad que fluctúa entre el 10 y 30 %. La capacidad solo es uno de los factores para la selección de equipos, también hay que tomar en cuenta características propias de cada operación unitaria, por ejemplo, en una molienda el grado de humedad y contenido de grasa determinarán el tipo de molino (Casp, 2005, p. 134).

Cuando se han establecido la capacidad y los factores de cada equipo es posible seleccionarlos mediante catálogos o, si son muy específicos, diseñarlos y construirlos. Cuando la selección es mediante catálogo, las hojas de especificaciones técnicas deberán contener información acerca del material de construcción, dimensiones, parámetros de diseño, principio de funcionamiento, precio, tiempo de entrega, entre otros, que asegure la correcta selección del equipo (Casp, 2005, p. 134).

1.3.3.3. Ingeniería de detalle

El diseño de ingeniería de detalle es una etapa de pre-factibilidad técnica en la que se especifican las características del proceso de producción, que se estableció en la ingeniería básica. Su estudio define a detalle e integra tuberías accesorios e instrumentación a la tecnología de procesamiento. También describe áreas de apoyo a la producción como servicios generales, áreas sanitarias y externas (Smith, 2005, p. 649).

a) Diseño de tuberías, para diseñar el sistema de tuberías se analiza el diagrama PFD que especifica la dirección y composición de las corrientes y, en función de

este, se realiza el diagrama PI&D, en el cual se detallan las tuberías y el fluido que transportan en la planta (Smith, 2005, p. 649).

Una tubería queda perfectamente detallada si se sabe su material de construcción, diámetro nominal, diámetro interno, número de cédula, longitud y temperatura de trabajo. Las tuberías se identifican por colores y pueden ser de material polimérico o metálicas, su elección depende de las propiedades del fluido a transportar. El acero inoxidable es el material de uso más frecuente por su resistencia térmica, mecánica y química a la corrosión por ácidos y humedad. Al transportar vapor es necesario aislar la tubería con lana de vidrio o poliuretano, para evitar las pérdidas de calor, el radio crítico del aislante depende del material de la tubería, su diámetro y longitud (Perry, 1999, pp. 2 430 - 2 432).

b) Accesorios primarios, secundarios e instrumentación, se consideran accesorios primarios a las válvulas manuales y a las bombas, y secundarios a las trampas de vapor, codos, neplos, uniones, etc. Las válvulas de uso más frecuente son de tipo compuerta, esfera, mariposa y globo, su elección se basa en el control que se requiera sobre el fluido. Las bombas también presentan una gran variedad de tipos; sin embargo, su elección se basa no solo en el flujo que se requiere, sino también en las características del fluido (Perry, 1999, pp. 2 433 - 2 436).

La instrumentación detalla los lazos de control automático que se colocan en algunos procesos. Un lazo de control consta de un sensor que detecta un cambio en la variable a controlar y envía una señal al controlador que compara este valor con el establecido como referencia y ordena al agente de control (válvulas, interruptores) las acciones correctivas (Perry, 1999, p. 2 582).

c) Diseño de áreas externas, sanitarias y servicios generales, existen áreas de apoyo a la producción, en donde se realizan actividades complementarias de logística, administración, investigación, desarrollo e innovación de producto.

Las áreas sanitarias son imprescindibles para el normal funcionamiento de la planta, generalmente se ubican como un paso obligatorio al ingresar al área de

producción; sin embargo, se encuentran correctamente delimitadas. En este sector, el personal se prepara y provee de la indumentaria adecuada antes del ingreso al área de producción (Casp, 2005, p. 14).

El área de servicios generales comprende las oficinas, en donde se desempeñan actividades administrativas y de logística, que direccionan la producción de acuerdo con la demanda del mercado (Casp, 2005, p. 14).

El laboratorio de control de calidad y desarrollo de producto tiene influencia directa sobre los procesos. La producción a escala piloto requiere de un laboratorio de investigación fuerte que interactúe con las actividades en planta e intercambie información con el afán de mejorar las características del producto o plantear alternativas de nuevos productos. La versatilidad de las plantas a escala piloto permite realizar cambios considerables en su ordenamiento y distribución, para adoptar nuevas líneas de producción o mejorar las existentes (Quijano, 1995, p. 107).

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. MATERIALES Y EQUIPOS

2.1.1. MATERIALES

- Celdas de cuarzo de volumen reducido para espectrofotometría.
- Columna de vidrio de 50 cm de longitud.
- Columna PD-10, Sephadex G25M, Pharmacia.
- Dispositivos de ultrafiltración centrífuga, Amicon Ultra, volumen 15 mL, tamaño de poro 10 y 50 kDa.
- Micropipetas de 50 a 1 000 μ L.
- Semillas de amaranto, arveja, chocho, fréjol y sangorache.
- Tubos de ensayo.
- Tubos Eppendorff.
- Tubos para centrifuga.
- Unidades de filtración, Hydrophilic PVDF 0,45 μ m, Millipore Millex-HV.
- Kitasato.
- Embudo Büchner.

2.1.2. EQUIPOS

- Balanza analítica, DENVER, 210 g, 0,1 mg.
- Baño termostático, Memmert, modelo DIN 40 050, 100 °C.
- Baño ultrasónico, Branson, modelo 1 510.
- Bomba de vacío, Thermo, modelo 420-2 901, 0,02 HP.
- Bomba peristáltica, GILSON, modelo Miniplus 2.
- Centrifuga, Clay Adams, 2 800 \times g.
- Centrifuga, WIFUG, modelo 2 000E, 5 200 rpm.
- Equipo de cromatografía, Pharmacia, modelo LKB-FRAC 100.
- Equipo PhastSystem Electrophoresis, Pharmacia, modelo 80-1 320-15.

- Espectrofotómetro Uv-Vis, Hitachi, modelo U-1 900.
- Estufa, Memmert, modelo DIN 40 050-IP 20.
- Molino manual, CORONA, modelo GR-120.
- Plancha de agitación magnética, Thomas, modelo 215, 900 rpm.
- pHmetro, HANNA, modelo HI3 220.
- Rotavapor, IKA, modelo RV10B599.

2.1.3. REACTIVOS

- Acetato de sodio, grado analítico, MERCK.
- Ácido acético glacial, grado analítico, Monterrey.
- Ácido bórico, grado analítico, MERCK.
- Ácido clorhídrico, grado reactivo 38 %, J.T. Baker.
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), grado analítico, J.T. Baker.
- Ácido tricloroacético, grado analítico, SIGMA.
- Acrilamida, grado electroforesis, Fluka, BioChemika.
- Albumina bovina, pureza 96 %, SIGMA.
- Azul brillante de bromofenol, grado electroforesis, FisherBioTech.
- Azul brillante de Coomassie R 250, grado electroforesis, FisherBioTech.
- Bisacrilamida, grado electroforesis, Fluka BioChemika.
- Carboxipeptidasa A, > 50 unidades/mg, SIGMA.
- Caseína, grado analítico, MERCK.
- Cloruro de potasio, 99 % de pureza, SIGMA.
- Dimetil formamida, 99 % de pureza, MallinckRODT.
- Dodecil sulfato de sodio, grado electroforesis, SIGMA.
- Estándar de proteínas 2,56 a 17,2 kDa, Pharmacia.
- Estándar de proteínas 6 a 180 kDa, Pharmacia.
- Fosfato diácido de sodio, grado analítico, MERCK.
- Hidróxido de sodio, grado analítico, MERCK.
- L-cisteína, 97 % de pureza, SIGMA.
- Matriz de afinidad tripsina-glioxil-sepharosa 6B-CL.
- 2-Mercaptoetanol, grado electroforesis, MERCK.

- N- α Benzoil, L-arginil p-nitroanilida (BApNA), grado analítico, SIGMA.
- Papaína, 3,18 U/mg, BioChemika.
- Peryodato de sodio, grado analítico, BDH.
- 1-Propanol, pureza 99 %, BDH.
- Quimotripsina, >40 unidades/mg, SIGMA.
- Sulfato cúprico pentahidratado, pureza 99 %, Fluka, BioChemika.
- Tripsina, 1:250, GIBCO.
- Tris HCl, grado analítico, Fisher.
- Yoduro de potasio, pureza 99 %, Panreac.

2.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ACUOSOS CLARIFICADOS A PARTIR DE SEMILLAS DE AMARANTO (*Amaranthus caudatus* L.), ARVEJA (*Pisum sativum* L.), CHOCHO (*Lupinus mutabilis*), FRÉJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) Y SANGORACHE (*Amaranthus hybridus* L.)

Las semillas de amaranto (*Amaranthus caudatus* L.), arveja (*Pisum sativum* L.), chocho (*Lupinus mutabilis*), fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) y sangorache (*Amaranthus hybridus* L.), originarias de la región Andina del Ecuador, fueron cultivadas, beneficiadas y donadas por el Departamento de Producción de Semillas del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Estación Santa Catalina.

Luego de la recepción, las semillas fueron molidas hasta obtener partículas menores a 1 mm.

2.2.1. DESENGRASADO DE LAS HARINAS DE LAS SEMILLAS

La grasa de las harinas se retiró mediante una extracción sólido-líquido con 1-propanol, como solvente, en una relación harina:solvente 1:4; la mezcla se

mantuvo en agitación durante 30 min. Luego, se filtró en un embudo Büchner conectado a un kitasato y este a una bomba de vacío. Para todas las semillas fue necesario repetir el ensayo, hasta que el filtrado no presentó turbidez. Las harinas desengrasadas fueron secadas en una estufa a 30 °C, durante 24 h (Mosquera, 1999, p. 40).

Se realizó la recuperación del solvente, mediante destilación, en un rotavapor a 65 °C. El 1-propanol recuperado se reutilizó en el proceso.

2.2.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS DE LAS HARINAS DE LAS SEMILLAS

La harina desengrasada de cada semilla se suspendió en una solución tampón fosfato de sodio 50 mM, en una relación harina:tampón 1:5, por el lapso de 1,5 h, con agitación constante. Luego, la mezcla se centrifugó a $850 \times g$, durante 30 min. El sobrenadante se ultrafiltró a través de una membrana de 50 kDa, con centrifugación a $2\ 800 \times g$, durante 1 h. Se descartó el retenido. Se recolectó el permeado de la membrana, al que se designó como **extracto crudo** (Muñoz, 2011, p. 26).

El pH de la solución tampón se ajustó con una solución de NaOH 0,5N, de acuerdo con el pH óptimo de trabajo de cada enzima, de la siguiente manera; para tripsina, quimotripsina y carboxipeptidasa A el pH de trabajo fue 7,5; mientras que, para papaína el pH de trabajo fue 6,5 (Sigma Aldrich, 2014).

2.2.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

La determinación de la concentración proteica en los extractos, para todas las etapas de purificación, se realizó espectrofotométricamente por el método de absorción en el ultravioleta (Aitken y Learmoth, 2002, p. 3) o el método de Biuret (Fernández y Galván, 2006, p. 4), que se describen a continuación.

2.1.1.1. Método de absorción en el ultravioleta

Para la determinación de la concentración proteica mediante el método de absorción en el ultravioleta, se colocaron 1,5 mL de muestra, en una celda de cuarzo de volumen reducido, y se midió la absorbancia a 280 nm, frente a la solución tampón fosfato, como blanco. Cuando la lectura fue mayor a 1, se realizaron diluciones de la muestra con el mismo tampón. El cálculo de la concentración de proteína se realizó mediante la Ecuación 2.1. En el Anexo I se presenta un ejemplo de cálculo.

$$[P] = \frac{DO_{280} \times f}{\epsilon \times L} \quad [2.1]$$

Donde

- [P]: Concentración de proteína (mg/mL),
 DO₂₈₀: Lectura de absorbancia a 280 nm,
 f: Factor de dilución, cuando fue necesario,
 L: Longitud que atraviesa la luz en la celda (cm),
 ε: Coeficiente de extinción de la muestra a 280 nm. Se consideró un valor arbitrario de 1,0 (mg/mL)⁻¹ cm⁻¹.

2.1.1.2. Método de Biuret

Para la determinación de la concentración proteica mediante el método de Biuret, se realizó una curva de calibración con una solución estándar de albúmina bovina (20 mg/mL). Se añadió 1 mL de reactivo Biuret a las muestras y a las soluciones estándar, que se prepararon como se indica en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Protocolo para la determinación de la concentración proteica por el método de Biuret

Numero de tubo	Reactivos		
	Sol. Estándar (μL)	Agua (μL)	R. Biuret (mL)
1	100	0	1
2	75	25	1
3	50	50	1
4	25	75	1
Blanco	0	100	1
Muestra			
5	100	0	1

(Fernández y Galván, 2006, p. 4)

Las soluciones se agitaron y se midió la absorbancia a 545 nm, frente al blanco que se indica en la Tabla 2.1.

Para preparar el reactivo de Biuret se disolvieron 1,90 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 3,35 g de NaEDTA en 350 mL de agua. Luego se adicionaron 200 mL de NaOH 5N y 1,00 g de KI, como estabilizante (Fernández y Galván, 2006, p. 6).

Se construyó la curva de calibración Absorbancia vs. Concentración de proteína y, con la ecuación de la línea de tendencia, se determinó la concentración de proteína, en mg/mL, de los extractos en todas las etapas de purificación. En el Anexo I se presenta la curva de calibración y un ejemplo de cálculo.

2.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA FRENTE A CARBOXIPEPTIDASA A, PAPAÍNA O QUIMOTRIPSINA, EN LOS EXTRACTOS OBTENIDOS

La actividad inhibidora (AI) fue definida como la diferencia de actividad enzimática determinada en presencia del inhibidor, respecto a la actividad enzimática detectada en ausencia de él.

2.3.1. ACTIVIDAD INHIBIDORA FRENTE A TRIPSINA DEL EXTRACTO DE SEMILLAS DE SANGORACHE

Se realizaron pruebas preliminares para comparar la actividad inhibidora frente a tripsina del extracto crudo de semillas de sangorache, con N-benzoil-arginil-p-nitroanilida (BAPNA), como sustrato, versus la actividad inhibidora producida por el mismo extracto crudo en tripsina con caseína, como sustrato.

2.3.1.1. Determinación de la actividad inhibidora frente a tripsina, producida por el extracto crudo de semillas de sangorache, con BAPNA como sustrato

Primero, se determinó la actividad proteolítica de la tripsina mediante espectrofotometría, según el método desarrollado por Earlander et al. (1961), modificado por Muñoz (2011) y que utiliza BAPNA como sustrato. En una celda de cuarzo se realizó una mezcla de 3,05 mL de tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7,5 con 0,1 mL de una solución de tripsina en tampón (5 mg/mL). Para iniciar la reacción se adicionaron 0,05 mL de BAPNA, disuelto en dimetil formamida (DMF), (5 mg/mL). Se agitó suavemente el contenido de la celda y se midió el cambio de la absorbancia a 410 nm, cada 15 s, durante 3 min (p. 25).

Para preparar el blanco de la reacción se procedió del mismo modo descrito anteriormente, pero la solución de enzima se reemplazó con tampón fosfato de sodio.

Para calcular la actividad proteolítica de la tripsina en U/ml se utilizó la Ecuación 2.2 (Reina, 2000). En el Anexo II se presenta un ejemplo de cálculo.

$$AE = \frac{\Delta DO_{410}}{\Delta t} \times \frac{1000 \times V_T}{\epsilon \times L \times V_e} \quad [2.2]$$

Donde

AE:	Actividad enzimática (U/mL),
$\frac{\Delta DO_{410}}{\Delta t}$:	Pendiente del gráfico absorbancia vs. tiempo,
1000:	Factor de conversión,
V_T :	Volumen total de la mezcla, 3,2 mL,
ϵ :	Coefficiente de extinción de p-nitroanilina a 410 nm ($8\ 800\ M^{-1}cm^{-1}$),
L:	Longitud que atraviesa la luz en la celda (cm),
V_e :	Volumen de la enzima que participa en la reacción (mL).

Luego, se midió la actividad de tripsina en presencia del extracto crudo de semillas de sangorache, con el mismo procedimiento anteriormente descrito; en el cual se reemplazaron 0,6 mL de tampón fosfato de sodio por extracto crudo obtenido de semillas de sangorache. El volumen final de la mezcla en la celda siempre fue 3,2 mL (Muñoz, 2011, p. 27).

2.3.1.2. Determinación de la actividad inhibidora frente a tripsina, producida por el extracto crudo de semillas de sangorache, con caseína como sustrato

La actividad inhibidora producida por el extracto crudo de semillas de sangorache en tripsina, con caseína como sustrato, se determinó mediante el método descrito por Becker, Makkar y Siddhuraju (2007, p.7), modificado.

Para cuantificar la actividad de la tripsina en ausencia del inhibidor, se colocaron en un tubo de ensayo 0,5 mL de solución de tripsina (1 mg/mL), con 0,5 mL de tampón fosfato de sodio 50 mM, a pH 7,5. La mezcla se llevó a un baño termostático a 37 °C, se agregó 1 mL de solución de caseína al 1 % (p/v), precalentada a 37 °C, y se mantuvo 10 min, con agitación moderada. La reacción fue terminada súbitamente con 3 mL de una solución que contenía 1,8 % de ácido tricloroacético (TCA), 1,8 % de acetato de sodio y 2,0 % de ácido acético glacial.

La mezcla se mantuvo en el baño termostático a 37 °C durante 30 min adicionales, para procurar la precipitación. Luego se filtró y se midió la absorbancia del filtrado a 275 nm frente al blanco.

Para preparar el blanco se procedió del mismo modo antes descrito, pero se agregó primero la solución con TCA y luego la solución de caseína.

La actividad enzimática de tripsina, con caseína como sustrato, se calculó mediante la Ecuación 2.3 (Becker, Makkar y Siddhuraju, 2007, p.9). Un ejemplo de cálculo se presenta en el Anexo II.

$$A_c = \frac{h}{(0,1)^2} \quad [2.3]$$

Donde

A_c : Actividad de la enzima (U/mL),

h : Promedio de las lecturas de absorbancia a 275 nm.

La actividad proteolítica de tripsina en presencia del extracto crudo de semillas de sangorache se determinó con el mismo método descrito al iniciar esta sección. En este caso, el tampón fosfato de sodio 50 mM, se reemplazó con 0,5 mL de extracto crudo de semillas de sangorache.

Los ensayos se realizaron por triplicado. Cada repetición se experimentó en tubos paralelos para asegurar la reproducibilidad de los resultados.

2.3.2. ACTIVIDAD INHIBIDORA FRENTE A CARBOXIPEPTIDASA A, PAPAÍNA Y QUIMOTRIPSINA PRODUCIDA POR LOS EXTRACTOS CRUDOS

A partir de la comparación de la actividad inhibidora de la tripsina frente al extracto de semillas de sangorache, con BApNA como sustrato, versus la actividad inhibidora producida por el mismo extracto en tripsina con caseína, como sustrato, se adaptó el método de Becker, Makkar y Siddhuraju (2007, p. 7), descrito en el Anexo II.2, según la naturaleza de las enzimas y extractos estudiados, como se indica en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Condiciones de las enzimas y extractos para la determinación de la actividad inhibidora según el método establecido por Becker, Makkar y Siddhuraju

Enzima Parámetros	CPA	Quimotripsina	Papaína
Volumen de enzima (mL)	0,5	0,5	0,1
Concentración de enzima($\mu\text{g/mL}$)	50,0	40,0	1000,0
Volumen de extracto (mL)	0,5	0,4	0,7
pH	7,5	7,5	6,5

Las soluciones de CPA y quimotripsina se prepararon en tampón fosfato de sodio 50 mM; mientras que, la de papaína se preparó en tampón fosfato de sodio 100 mM que contenía cisteína 50 mM y EDTA 20 mM, como agentes activadores y estabilizantes (Sigma Aldrich, 2013).

2.3.2.1. Determinación de la actividad inhibidora frente a CPA producida por los extractos crudos de las cinco especies, bajo nuevas condiciones de experimentación

Para verificar si el volumen de CPA o extracto tiene influencia en la inhibición se planteó un nuevo diseño experimental 3^2 , para cada semilla, en el cual los factores fueron el volumen de la enzima y el volumen del extracto. Los niveles

fueron 500, 750 y 1 000 μ L. El ensayo de la actividad inhibidora se desarrolló según el método de Becker, Makkar y Siddhuraju (2007, p. 7), descrito en el Anexo II. El análisis estadístico de los resultados se realizó como se indica en el acápite 2.3.4.

2.3.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA ESPECÍFICA

Para medir el nivel de pureza de los extractos en las diferentes etapas, se determinó la actividad inhibidora específica (AIE), como la actividad inhibidora por unidad de masa. La AIE se calculó mediante la Ecuación 2.4 (El-Yassin, 2012, p. 2). Un ejemplo de cálculo se presenta en el Anexo II.4.

$$AIE = \frac{AI}{[P]} \quad [2.4]$$

2.3.4. SELECCIÓN DE LOS EXTRACTOS CON MAYOR AIE PARA CARBOXIPEPTIDASA A, PAPAÍNA O QUIMOTRIPSINA

Se seleccionó el extracto que presentó la mayor actividad inhibitoria específica para cada una de las proteasas, mediante un diseño experimental unifactorial completamente al azar, donde la variable fue la semilla: amaranto, arveja, chocho, fréjol y sangorache. El parámetro de control fue la actividad inhibidora específica.

Los ensayos se realizaron por triplicado. Cada repetición se ensayó en paralelo; los resultados se analizaron con el programa Statgraphics Centurion XV, mediante el test de rangos múltiples, con un nivel del 95 % de confianza, según el método de Fisher, para determinar las diferencias significativas entre las medias, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

De los resultados obtenidos para la actividad inhibidora específica se seleccionó el extracto que presentó la mayor actividad inhibidora de cada proteasa y luego se usó para ser purificado selectivamente.

2.4. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA FRACCIÓN INHIBIDORA MÁS ACTIVA DE CADA UNA DE LAS PROTEASAS

2.4.1. PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO INHIBIDOR MÁS ACTIVO FRENTE A CADA UNA DE LAS PROTEASAS

Los extractos crudos que presentaron mayor actividad inhibidora fueron nuevamente filtrados con una membrana de 10 kDa, a $2\ 800 \times g$, durante 30 min. Se determinó la concentración de proteína, la actividad inhibidora y la actividad inhibidora específica de los permeados y retenidos de la filtración. Luego fueron tratadas a 60 °C, por 30 min, y con TCA, de acuerdo con los métodos desarrollados por Muñoz (2011, pp. 30,31).

Las fracciones que presentaron mayor actividad inhibidora se purificaron por cromatografía líquida, en una matriz de tripsina-glioxil-sepharosa 6B-CL, de acuerdo con lo planteado por Echeverría (2014), según el protocolo que desarrolló Bonzón (1996, p. 36), modificado por Quinchuela (2013, pp. 31-42).

En todas las etapas se determinó el grado de purificación, que se define como el coeficiente entre los valores de AIE que se obtienen luego y antes del proceso de purificación.

2.4.2. CONCENTRACIÓN DE LAS MUESTRAS POR EVAPORACIÓN

Las muestras fueron concentradas en un rotavapor, a una temperatura de 55 °C, una presión de vacío de 6 Pa, durante 4 min. El volumen de la muestra fue reducido 4 veces. Este procedimiento se efectuó para obtener la concentración de proteína mínima (5 mg/mL), que se requiere para la determinación del peso molecular mediante electroforesis.

2.4.3. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA FRACCIÓN INHIBIDORA MÁS ACTIVA DE CADA UNA DE LAS PROTEASAS

2.4.3.1. Determinación del peso molecular de la fracción inhibidora más activa de cada una de las proteasas

Se realizó una corrida electroforética preliminar de los extractos crudos de las semillas de fréjol y chocho de acuerdo con el método desarrollado por Félix, 2008, (pp. 43-46). El procedimiento se detalla en el Anexo III.

La determinación del peso molecular de la fracción inhibidora que presentó mayor actividad en cada proteasa, se desarrolló mediante la técnica de electroforesis (SDS-PAGE), según el método de Laemmli (1970, pp. 680-685), modificado. Las corridas electroforéticas se realizaron en un equipo Pharmacia PhastSystem Electrophoresis, sobre un gel prefabricado.

Primero, fue necesario realizar corridas electroforéticas al 12,5; 15,0; y 20,0 % de poliacrilamida, para determinar la concentración adecuada donde se observó una correcta migración de las proteínas que se usaron como estándares.

Las muestras a analizar se prepararon con el mismo tampón de muestra que se usó con los extractos crudos. Los estándares utilizados correspondieron a proteínas de bajo peso molecular y péptidos, que generan cinco bandas desde 2,56 hasta 17,20 kDa.

El gel se depositó en la cámara para la corrida electroforética. La corrida duró 90 min, luego el gel se reveló mediante los procesos de fijación, teñido y decoloración, que duraron 45 min. Para obtener bandas bien definidas, el gel se depositó en un recipiente con agua destilada, durante 48 h.

Los gels fueron escaneados para la determinación de los pesos moleculares, mediante la comparación de su movilidad electroforética con la movilidad de los estándares.

2.4.3.2. Determinación del valor de IC₅₀ de la fracción inhibidora más activa de cada una de las proteasas

Para determinar el IC₅₀ se procedió de la siguiente manera:

Se prepararon soluciones de caseína al 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 y 2,5 % en condiciones desnaturalizantes, como se indica en el Anexo II; para cada concentración de sustrato se determinó la actividad enzimática y la actividad inhibidora frente a tres concentraciones de la fracción enriquecida con el inhibidor, mediante el método de Becker, Makkar y Siddhuraju (2007, p. 7), descrito en el Anexo II.

Para determinar las constantes de Michaelis-Menten (Km) y las velocidades máximas (V_{máx}) se obtuvieron las ecuaciones de Michaelis-Menten que se linealizaron según el método de Lineweaver-Burk. Se realizaron los gráficos de dobles recíprocos, se compararon los valores de Km y V_{máx} entre los obtenidos en ausencia del inhibidor y los obtenidos a tres concentraciones del mismo para determinar el tipo de inhibición.

El valor de Ki se estableció como el valor de IC₅₀ que se determinó mediante las ecuaciones 2.4, 2.5, 2.6, 2.7 (Nelson y Cox, 2009, p. 210).

$$V_{\text{máxaparente}} = \frac{V_{\text{máx}}}{\alpha'} \quad [2.4]$$

$$Ki' = \frac{[I]}{\alpha' - 1} \quad [2.5]$$

$$Km_{\text{aparente}} = \alpha Km \quad [2.6]$$

$$Ki = \frac{[I]}{\alpha - 1} \quad [2.7]$$

Donde

$V_{\text{máx aparente}}$:	Velocidad máxima en presencia del extracto inhibidor (U/mL),
$V_{\text{máx}}$:	Velocidad máxima (U/mL),
α' :	Relación entre $V_{\text{máx}}$ y $V_{\text{máx aparente}}$,
K_i' :	Constante de inhibición o valor de IC_{50}' ,
$[I]$:	Concentración del inhibidor (mM),
K_m :	Constante de Michaelis-Menten,
$K_{m\text{ aparente}}$:	Constante de Michaelis-Menten en presencia del extracto inhibidor,
α :	Relación entre $K_{m\text{ aparente}}$ y K_m ,
K_i :	Constante de inhibición o valor de IC_{50} (mM).

2.5. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LAS SOLUCIONES CONCENTRADAS DEL INHIBIDOR MÁS ACTIVO FRENTE A LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO

Se incubaron soluciones concentradas de los inhibidores seleccionados a las temperaturas de - 20 °C (congelamiento), 4 °C (refrigeración) y 17 °C (ambiente), durante 4 semanas. Al inicio y luego de cada semana de almacenamiento se tomaron alícuotas para determinar la actividad inhibidora, según el método descrito en el Anexo II.2 (Echavarría, 2008, p. 287).

El análisis estadístico, se realizó con el programa Statgraphics Centurion XV, en el cual se calculó la desviación estándar de la actividad inhibidora y mediante el test de rangos múltiples con un nivel del 95 % de confianza, se determinaron las diferencias estadísticas significativas entre las medias.

2.5.1. CÁLCULO DE LA CONSTANTE DE INACTIVACIÓN

La constante de inactivación (K_{int}) se determinó a partir del gráfico Actividad Inhibidora vs. Tiempo, que se supone sigue un modelo de decaimiento de primer

orden. Además, se consideró el valor de R^2 mayor a 0,95 en la linealización del gráfico. Se calculó la constante de inactivación según la Ecuación 2.8.

$$AI = A_0 e^{-k_{int}t} \quad [2.8]$$

Donde

AI: Actividad inhibidora,
 A_0 : Actividad inicial,
 k_{int} : Constante de inactivación,
 t: tiempo en semanas.

2.6. DISEÑO DE UNA PLANTA PILOTO PARA LA OBTENCIÓN DE INHIBIDORES PURIFICADOS DE CARBOXIPEPTIDASA A, PAPAÍNA O QUIMOTRIPSINA

Se diseñó una línea de producción a escala piloto para la obtención de 5 L/día de solución inhibidora semipurificada, que en este estudio se denominará planta piloto, en la cual se determinaron las operaciones unitarias requeridas para el proceso, se estableció la capacidad de procesamiento, según la posible demanda de individuos infectados con malaria durante los próximos dos años en Ecuador. Se calcularon los balances de masa y energía, de acuerdo con la capacidad de producción. Luego se seleccionaron los equipos, mediante catálogo.

La cantidad de vapor y el dimensionamiento del caldero se determinaron según el balance de energía, mediante las Ecuaciones 2.9 y 2.10.

$$Q = m \text{ vapor} \times Lv \quad [2.9]$$

$$\text{Capacidad del caldero} = \frac{\text{Energía total requerida}}{\text{Tiempo que interviene la energía en los procesos}} \quad [2.10]$$

Donde

- Q: Cantidad de energía necesaria (kJ/d),
m vapor: Masa de vapor, (kg/d),
Lv: Calor latente de vaporización (2 171,73 kJ/kg), a 40 psi y 130,68 °C.

También se realizaron los diagramas de bloques del proceso de producción (BFD) y de flujo del proceso tecnológico (PFD), así como la distribución del área de producción (LAY OUT). Por último, se diseñaron las áreas administrativas, sanitarias y exteriores.

2.7. EVALUACIÓN DE LOS COSTOS DEL PROYECTO

Se realizó una estimación de los costos para la obtención de los extractos con actividad inhibidora a escala piloto. Los costos del proyecto se estimaron para una producción de 5 L/día de solución, con actividad inhibidora de quimotripsina y papaína. Los costos de los equipos, reactivos e insumos se determinaron de acuerdo con las cotizaciones emitidas por empresas relacionadas con la fabricación e importación de equipos, reactivos e insumos para la industria alimenticia y farmacéutica (Sapag y Sapag, 2003, p. 232). El costo de las semillas se determinó según las cotizaciones emitidas por el INIAP.

Por otra parte, se consideró el costo de la energía eléctrica y agua potable necesarios para el funcionamiento de la planta piloto, con base en las tarifas fijadas por las respectivas empresas que suministran estos servicios en Ecuador (Sapag y Sapag, 2003, p. 236). El costo de mano de obra se determinó según los salarios fijados en la legislación ecuatoriana (Sapag y Sapag, 2003, p. 238).

Por último, se estimó el costo por mL para la obtención de los extractos, a escala piloto, mediante la sumatoria de los costos de las materias primas, los reactivos e insumos, costo de la instalación de la planta piloto y su operación, calculados como se indicó anteriormente.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS A PARTIR DE SEMILLAS DE AMARANTO, ARVEJA, CHOCHO, FRÉJOL Y SANGORACHE

La presente investigación se desarrolló con semillas de amaranto, arveja, chocho, fréjol y sangorache. Esta selección se basó en estudios anteriores, como el desarrollado por Muñoz (2011), que evidenció la presencia de inhibidores de tripsina, principalmente en chocho (*L. mutabilis*, var. INIAP-450 Andino), fréjol (*P. vulgaris*, var. INIAP-414 Yunguilla), arveja (*P. sativum*, var. INIAP-432 Lojanita), entre otros (p. 73).

El amaranto (*Amaranthus caudatus* L.) y el sangorache (*Amaranthus hybridus* L.) tienen un elevado contenido de proteínas. Según el estudio desarrollado por Gómez (2013) en las semillas de estos pseudo cereales también se ha identificado un alto contenido de inhibidores de proteasas (p. 14).

3.1.1. DESENGRASADO DE LAS HARINAS DE LAS SEMILLAS

Luego de la recepción, las semillas fueron molidas y apropiadamente empacadas para evitar que se humedezcan o contaminen.

La grasa de las harinas de las semillas se retiró con 1- propanol, como solvente, según se detalla en el acápite 2.2.1. Fue necesario repetir el procedimiento hasta que el solvente filtrado no presentó turbidez. En la Tabla 3.1 se muestra el número de veces que se repitió el ensayo para cada semilla y el rendimiento que se obtuvo.

Tabla 3.1. Número de contactos harina-solvente para la extracción de grasa de las harinas de las semillas y su rendimiento

Tipo de semilla	Contactos	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Masa removida (g)
Amaranto	6	25,00	23,84	1,16
Arveja	4	25,00	24,06	0,94
Chocho	10	25,00	21,96	3,04
Fréjol	7	25,00	23,83	1,17
Sangorache	4	25,00	23,81	1,19

Según las tablas de composición de alimentos de la FAO, el contenido de grasa de amaranto, arveja, chocho, fréjol y sangorache es 7, 4, 16, 5 y 6 %, respectivamente. De acuerdo con esta información, el porcentaje de grasa total removida de las semillas fue aproximadamente para amaranto del 66,28 %, arveja del 94,00 %, chocho del 76,00 %, fréjol del 93,60 % y sangorache del 79,33 %.

Aliaga (2007) señaló que el desengrasado es, sin duda, favorable en el proceso de purificación de inhibidores que provienen de materias primas con contenidos de grasa mayores al 2 % (p. 97). Así mismo, Betancur, Guerrero, Hernández y Marrufo (2012) determinaron que el desengrasado aumentó la composición proximal de proteína cruda de 28,01 al 65,60 % en harina de *Jatropha curcas*, cuyos hidrolizados proteínicos se usaron en la inhibición de la enzima convertidora de Angiotensina I (p. 388).

3.1.1. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS DE LAS HARINAS DE LAS SEMILLAS Y DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

Luego de la homogenización se obtuvieron aproximadamente 10 mL de extracto crudo. Los resultados de la concentración de proteína de los extractos crudos determinada con los métodos de absorción en el ultravioleta y Biuret, descritos en el acápite 2.2.3, se presentan en la Tabla 3.2.

El análisis estadístico se realizó como se indica en el acápite 2.3.4.

Tabla 3.2. Concentración de proteína en mg/mL de los extractos crudos, determinada según los métodos de absorción en el ultravioleta y Biuret.

Tipo de semilla	[P] (mg/mL)	
	Absorción en el ultravioleta	Método de Biuret
Amaranto	9,40 ± 0,12 ^D	8,34 ± 0,16 ^E
Arveja	9,59 ± 0,58 ^D	6,35 ± 0,09 ^F
Chocho	28,63 ± 0,53 ^A	25,06 ± 0,14 ^B
Fréjol	11,63 ± 0,36 ^C	8,28 ± 0,22 ^E
Sangorache	5,12 ± 0,28 ^G	4,59 ± 0,11 ^H

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

Letras distintas en la tabla señalan diferencias estadísticas significativas (p < 0,05)

Todas las semillas registran valores de concentración de proteína más altos, cuando se emplea el método de absorción en el ultravioleta; esto se debería a las interferencias que existen en las lecturas de la absorbancia a 280 nm. Además existen diferencias estadísticas significativas en la concentración de proteína de cada semilla, determinada por los dos métodos.

Fernández y Galván (2006) señalan que el método de absorbancia en el ultravioleta, pese a ser rápido y no destructivo, proporciona solo una estimación de la concentración de proteína; a diferencia del método de Biuret, en el cual interfieren pocas sustancias no proteicas, por consiguiente es más confiable (p. 4).

Si bien existen diferencias significativas en la concentración de proteína determinada por los dos métodos hay una correspondencia en los resultados, es así que el extracto crudo de chocho presenta mayor concentración de proteína y el extracto crudo de sangorache la menor concentración, con los dos métodos.

3.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA FRENTE A CARBOXIPEPTIDASA A, PAPAÍNA O QUIMOTRIPSINA, EN LOS EXTRACTOS OBTENIDOS

3.2.1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA FRENTE A TRIPSINA EN EL EXTRACTO CRUDO DE SANGORACHE, CON CASEÍNA Y BApNA COMO SUSTRATOS

Echeverría (2014) determinó la actividad inhibidora de tripsina, con extractos obtenidos de las mismas semillas usadas en el presente trabajo. El mejor resultado de actividad inhibidora fue encontrado en el extracto de sangorache con BApNA como sustrato (p. 100).

Para establecer un procedimiento general a ser aplicado en los ensayos posteriores de actividad inhibidora frente a carboxipeptidasa A, papaína y quimotripsina, con los extractos crudos de las cinco semillas, con caseína como sustrato. Se realizaron pruebas preliminares para determinar la actividad inhibidora generada por el extracto crudo de sangorache, frente a tripsina, con BApNA como sustrato, según lo descrito en el acápite 2.3.1.1. Este valor se relacionó con la actividad inhibidora frente a tripsina producida por el mismo extracto, con caseína como sustrato, según el procedimiento descrito en el acápite 2.3.1.3.

Se obtuvo un valor de actividad inhibidora de $355,30 \pm 15,20$ mU/mL, con BApNA como sustrato, y un valor de $64,74 \pm 1,45$ U/mL, con caseína como sustrato, que corresponden al 91,58 y 87,94 % de inhibición, respectivamente.

Del mismo modo, en otros trabajos, como el desarrollado por Zamora (2003), se determinó la actividad inhibidora de quimotripsina producida por extractos de *Canavalia ensiformis*, con caseína como sustrato (p. 2). Sigma-Aldrich (2014) también usó caseína como sustrato en sus ensayos para la determinación de

inhibidores de tripsina, quimotripsina y papaína provenientes de extractos de soya (*Glycine max*) (p.3).

Estos resultados muestran que se puede determinar la inhibición del extracto crudo de sangorache sobre tripsina, con los dos sustratos. De acuerdo con estos análisis, se estableció que el procedimiento descrito en el acápite 2.3.1.1 y detallado en el Anexo II, es adecuado para determinar también la inhibición frente a carboxipeptidasa A, papaína y quimotripsina, con los extractos de semillas de amaranto, arveja, chocho, fréjol y sangorache, con caseína como sustrato.

3.2.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA FRENTE A PAPAÍNA PRODUCIDA POR LOS EXTRACTOS DE AMARANTO, ARVEJA, CHOCHO, FRÉJOL Y SANGORACHE

Los resultados de la actividad proteolítica de papaína ($AE_{papaína}$), la actividad inhibidora (AI), concentración de proteína ([P]) y la actividad inhibidora específica (AIE), se muestran en la Tabla 3.3.

La actividad inhibidora producida por los extractos crudos de las cinco semillas frente a papaína, se determinó según el protocolo establecido por Becker, Makkar y Siddhuraju (2007, p. 7), que se detalla en el Anexo II.

Tabla 3.3. $AE_{papaína}$, AI, [P] y AIE producida por los extractos crudos de las cinco especies frente a papaína

Especies	$AE_{papaína}$ (U/mL)	AI (U/mL)	[P] (mg)	AIE (U/mg)
Amaranto	58,20 ± 1,89	20,47 ± 0,67 ^B	8,34 ± 0,16 ^B	2,45 ± 0,08 ^C
Arveja		20,57 ± 0,74 ^B	6,35 ± 0,09 ^C	3,24 ± 0,12 ^B
Chocho		11,78 ± 0,85 ^C	25,06 ± 0,14 ^A	0,47 ± 0,03 ^D
Fréjol		40,95 ± 1,22 ^A	8,28 ± 0,22 ^B	4,95 ± 0,15 ^A
Sangorache		11,83 ± 0,59 ^C	4,59 ± 0,11 ^D	2,58 ± 0,13 ^C

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 6)

Letras distintas en la misma columna señalan diferencias estadísticas significativas (p < 0,05)

La actividad proteolítica de papaína sobre caseína, en las condiciones establecidas, fue de 58,20 U/mL, con un coeficiente de variación del 3,24 %, en las seis lecturas que se tomaron.

Los extractos crudos de las cinco especies presentaron inhibición de papaína. La AI de las semillas de amaranto y arveja no mostraron diferencias significativas, los dos con valores cercanos a 20 U/mL con un coeficiente de variación de 3,50 % aproximadamente, lo que representa un porcentaje de inhibición del 35 %. La AI lograda por los extractos crudos de chocho y sangorache, que tampoco muestra diferencias significativas entre sí, provocan un porcentaje de inhibición del 20 %.

Por su parte, la AI del extracto crudo de fréjol fue de 40,95, con un coeficiente de variación del 2,98 %, que representa el mayor porcentaje de inhibición encontrado con el 70,36 %.

Molina (2010) determinó que el extracto crudo de fréjol (*Phaseolus vulgaris*) inhibió en un 80 % a α -amilasas y en un menor porcentaje a algunas aspárticoproteasas de la broca del café (p. 72), este resultado también corrobora la existencia de inhibidores en fréjol.

La Tabla 3.3 también presenta la actividad inhibidora específica, para cuya determinación se consideraron los resultados de concentración de proteína obtenidos con el método de Biuret, por ser el que presenta menores interferencias y, por tanto, genera resultados más confiables. El menor valor de AIE correspondió al extracto crudo de chocho con $0,47 \pm 0,03$ U/mg, esto se debe a que su AI es baja y el contenido proteico es alto, con relación a las demás semillas. El amaranto y el sangorache no presentaron diferencias significativas en la AIE, pese a que el amaranto generó un 73 % más de inhibición, pero con una concentración de proteína 81,7 % mayor a la concentración de proteína del sangorache.

La actividad inhibidora específica del extracto crudo de arveja de $3,24 \pm 0,12$ U/mg es 32,24 % mayor a la del extracto crudo de amaranto

($2,45 \pm 0,08$), aunque los dos no presentaron diferencias significativas en la actividad inhibidora; esto se debe a que, la concentración de proteína de arveja es 24 % menor a la de amaranto.

El extracto crudo de fréjol presentó el mayor valor de actividad inhibidora específica con $4,95 \pm 0,15$ U/mg, esto se debe a que presenta un valor de actividad inhibidora dos veces mayor a la actividad inhibidora de amaranto y arveja; y cuatro veces mayor para chocho y sangorache. Además presenta una baja concentración de proteína en comparación a la de chocho, por ejemplo, que es tres veces menor.

Hernández et al. (2013) también determinaron la actividad inhibidora y la actividad inhibidora específica frente a papaína, producida por extractos de las mismas semillas que se usaron en esta experimentación, con L-Piroglutamil-L-fenilalanil-L-leucina-p-nitroanilida (PFLNA), como sustrato. Encontraron una actividad inhibidora de $79,8 \pm 11,4$ mU/mL para el extracto de amaranto; $83,0 \pm 17,5$ mU/mL para el extracto de arveja; $19,0 \pm 5,9$ mU/mL para el extracto de chocho; $106,1 \pm 31,2$ mU/mL para el extracto de fréjol; y $51,5 \pm 5,8$ mU/mL para el extracto de sangorache.

Los métodos de obtención de los extractos y de medición de la AI fueron diferentes, esto explica la diferencia numérica en los valores reportados. Sin embargo existe una correspondencia de resultados entre los obtenidos por Hernández et al. (2013) y la presente investigación, ya que se experimentaron con las mismas semillas frente a la misma enzima.

En conclusión, se determinó que el extracto crudo de fréjol presentó la mayor AIE para papaína, con un valor de $4,95 \pm 0,15$ U/mg, el cual presenta diferencias estadísticas significativas con los demás extractos crudos, por lo que se trabajó con este extracto, para la inhibición de papaína, en las posteriores etapas de purificación y caracterización.

3.2.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA FRENTE A QUIMOTRIPSINA PRODUCIDA POR LOS EXTRACTOS DE AMARANTO, ARVEJA, CHOCHO, FRÉJOL Y SANGORACHE

Los resultados de la AI frente a quimotripsina de los extractos crudos de amaranto, arveja, chocho, fréjol y sangorache, que se determinó de acuerdo con el método desarrollado por Becker, Makkar y Siddhuraju (2007, p. 7), descrito en el Anexo II, con algunas modificaciones, que se detallan en la sección 2.3.2, se muestran a continuación en la Tabla 3.4.

EL cálculo de la AIE se realizó con la concentración de proteína determinada según el método de Biuret, mediante la Ecuación 2.4.

Se efectuó el análisis estadístico como se indica en la sección 2.3.4.

Tabla 3.4. $AE_{\text{quimotripsina}}$, AI, [P] y AIE producida por los extractos crudos de las cinco especies frente a quimotripsina

Especie	$AE_{\text{quimotripsina}}$ (U/mL)	AI (U/mL)	[P] (mg)	AIE (U/mg)
Amaranto	72,42 ± 1,48	3,25 ± 0,28 ^E	8,34 ± 0,16 ^B	0,39 ± 0,03 ^C
Arveja		13,23 ± 0,42 ^C	6,35 ± 0,09 ^C	2,08 ± 0,07 ^A
Chocho		55,00 ± 1,62 ^A	25,06 ± 0,14 ^A	2,19 ± 0,06 ^A
Fréjol		14,45 ± 0,68 ^B	8,28 ± 0,22 ^B	1,75 ± 0,08 ^B
Sangorache		7,95 ± 0,79 ^D	4,59 ± 0,11 ^D	1,73 ± 0,17 ^B

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 6)

Letras distintas en la misma columna señalan diferencias estadísticas significativas (p < 0,05)

La actividad proteolítica de quimotripsina fue de 72,42 U/mL, con caseína como sustrato, en las condiciones establecidas, con un coeficiente de variación del 2,05 %, en las 6 lecturas que se tomaron.

Los extractos crudos de las cinco especies presentaron inhibición de quimotripsina. El de chocho, con un valor de 55,00 ± 1,62 U/mL, fue el que mostró mayor AI, con diferencias estadísticas significativas con los demás extractos. Este valor representa el 75,95 % de inhibición. Los extractos crudos de arveja y fréjol

presentaron porcentajes de inhibición cercanos al 20 %; aunque, son estadísticamente diferentes entre sí. Los extractos crudos de amaranto y sangorache presentan los valores más bajos de AI, con porcentajes cercanos al 5 y 10 %, respectivamente.

Si bien, el extracto crudo de chocho presentó la mayor diferencia en la AI de quimotripsina, en comparación con los extractos de las otras especies, su alto contenido de proteína hace que no existan diferencias significativas en la AIE con el extracto crudo de arveja, que de manera recíproca, su bajo contenido de proteína genera altos valores de AIE.

Molina (2010) determinó que, el extracto purificado de *Lupinus bogotensis* presentó inhibición total frente a las aspártico proteasas de la broca del café, además concluyó que la secuencia amino-terminal tiene similitud con proteínas de las semillas de otras variedades del género *Lupinus*, como *albus* y *angustifolius* (pp. 18, 19).

Como se puede apreciar en la Tabla 3.4, la AIE de los extractos de fréjol y sangorache no presentan diferencias significativas; si bien la AI del extracto de fréjol es dos veces mayor a la del extracto de sangorache, la relación del contenido de proteína entre los dos extractos es la misma, por tanto el cociente de la actividad inhibidora con la concentración de proteína, para los dos extractos, es similar.

El extracto crudo de amaranto presenta el menor valor de actividad inhibidora específica, esto se debe, no solo a su baja actividad inhibidora ($3,25 \pm 0,28$ U/mL), sino también a su elevada concentración de proteína ($8,34 \pm 0,16$ mg/mL), con relación a los valores presentados para los demás extractos.

El mejor valor de actividad inhibidora específica correspondió al extracto de chocho con $2,19 \pm 0,06$ U/mg, aunque no se encontraron diferencias estadísticas significativas con el extracto de arveja, que registró un valor de $2,08 \pm 0,07$ U/mg.

La actividad inhibidora del extracto crudo de chocho en quimotripsina fue 4 veces mayor ($55,00 \pm 1,62$ U/mL), al reportado para arveja ($13,23 \pm 0,42$ U/mL), según los resultados que se muestran en la Tabla 3.4. Sin embargo, el alto contenido proteico del extracto crudo de chocho ($25,06 \pm 0,14$ mg/mL) hace que al determinar la actividad inhibidora específica no presente diferencias significativas con el extracto crudo de arveja.

Muñoz (2011), en su estudio sobre la inhibición de tripsina, preseleccionó los permeados del filtrado a 10 kDa de chocho (*L. mutabilis*, var. INIAP-450 Andino), fréjol (*P. vulgaris*, var. INIAP-414 Yunguilla), arveja (*P. sativum*, var. INIAP-432 Lojanita) y cebada (*Hordeum vulgare*, var. INIAP-Cañicapa), concluye que en la purificación, al someter las muestras a tratamiento térmico, existe una pérdida en la actividad inhibidora del extracto de chocho de 18,31 % y en el extracto de arveja de 47,72 % (p. 45).

En el presente estudio se plantea un procedimiento de purificación parcial con tratamiento térmico y, de acuerdo con los resultados obtenidos por Muñoz (2011), no es conveniente seleccionar el extracto crudo de arveja para las posteriores etapas de purificación por su elevado porcentaje de pérdida de actividad inhibidora en el tratamiento térmico.

En conclusión, se seleccionó el extracto crudo de chocho en la inhibición de quimotripsina, para las posteriores etapas de purificación y caracterización, pese a no presentar diferencias estadísticamente significativas con el extracto crudo de arveja, por las razones expuestas anteriormente.

3.2.4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA FRENTE A CARBOXIPEPTIDASA A, PRODUCIDA POR LOS EXTRACTOS DE AMARANTO, ARVEJA, CHOCHO, FRÉJOL Y SANGORACHE

Los resultados de la actividad proteolítica frente a carboxipeptidasa A en presencia y ausencia de los extractos crudos de amaranto, arveja, chocho, fréjol y sangorache, que se determinó de acuerdo con el método desarrollado por Becker, Makkar y Siddhuraju (2007, p. 7), descrito en el Anexo II, con algunas modificaciones, que se detallan en la sección 2.3.2, se muestran en la Tabla 3.5.

Se realizó el respectivo análisis estadístico de manera similar al efectuado para papaína y quimotripsina.

Tabla 3.5. Actividad proteolítica en presencia y ausencia de los extractos crudos de las cinco especies frente a CPA

Especie	AE _{CPA} (U/mL)	AE* _{CPA} (U/mL)
Amaranto	28,58 ± 1,31	27,20 ± 0,70 ^A
Arveja		28,68 ± 0,56 ^A
Chocho		27,52 ± 0,61 ^A
Fréjol		28,65 ± 0,81 ^A
Sangorache		27,20 ± 1,18 ^A

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 6)

Letras distintas en la misma columna señalan diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$)

* Actividad proteolítica en presencia del extracto inhibidor

La actividad proteolítica de carboxipeptidasa A fue de 28,58 U/mL con un coeficiente de variación de 4,57 %, bajo las condiciones especificadas, con caseína como sustrato.

Se determinó la actividad proteolítica en presencia de los extractos crudos de las cinco especies, como se indica en la Tabla 3.5, en la cual se observa que no existen diferencias estadísticas significativas entre ninguno de los extractos, todos

presentan un valor aproximado a 28 U/mL, con coeficientes de variación inferiores al 5 %.

Además, se realizó el análisis estadístico para comparar la actividad proteolítica de CPA, en presencia y ausencia de los extractos inhibidores, cuyos resultados tampoco muestran diferencias estadísticas significativas.

Según los resultados que se muestran en la Tabla 3.5 y el análisis estadístico realizado, se concluye que los extractos crudos de amaranto, arveja, chocho, fréjol y sangorache no producen inhibición de carboxipeptidasa A, bajo las condiciones de experimentación establecidas y con caseína como sustrato.

Chávez et al. (2003) encontraron actividad inhibidora de CPA en extractos de algunos organismos marinos. La especie *Zoanthus pulchellus* presentó la mayor actividad inhibidora específica, con un valor de 82,38 U/mg, con N-(4-Metoxi fenil azoformil)-L-fenil alanina (AAFP), como sustrato. La unidad de actividad enzimática la definieron como la cantidad de carboxipeptidasa A necesaria para hidrolizar un μmol de AAFP.

Hernández et al. (2013) obtuvieron inhibición de CPA con los extractos de arveja, con un valor de $0,6 \pm 0,3$ mU/mg y de fréjol, con un valor de $1,0 \pm 0,3$ mU/mg. Los métodos para la obtención y caracterización de los extractos fueron diferentes a los utilizados en la presente investigación.

Según los trabajos citados anteriormente, existe inhibición de CPA con extractos de algunas especies marinas y con dos de las cinco semillas también usadas en esta investigación, razón por la cual fue necesario ajustar las condiciones de experimentación fijadas en la sección 2.3.2.

En la Tabla 3.6 se resumen los resultados y el análisis estadístico del diseño experimental 3^2 , que se detalló en la sección 2.3.2.1, el mismo que fue propuesto para la determinación de la actividad inhibidora frente a CPA, de los extractos crudos de las cinco especies.

Tabla 3.6. Actividad proteolítica de carboxipeptidasa A en presencia y ausencia de los extractos crudos de las cinco especies

Parámetro a evaluar	Volumen de extracto (μL)	Volumen de CPA (μL)		
		500	750	1 000
AE _{CPA} (U/mL)		27,57 ± 0,94 ^A	43,92 ± 0,75 ^B	54,24 ± 1,53 ^C
		26,85 ± 0,57 ^A	44,13 ± 0,97 ^B	53,11 ± 2,43 ^C
		26,99 ± 0,60 ^A	43,57 ± 1,22 ^B	54,76 ± 2,00 ^C
Amaranto	500	27,20 ± 0,72 ^A	43,82 ± 1,15 ^B	53,02 ± 2,50 ^C
	750	27,23 ± 0,49 ^A	43,92 ± 1,17 ^B	52,12 ± 1,54 ^C
	1 000	27,02 ± 0,54 ^A	44,12 ± 0,71 ^B	52,87 ± 2,01 ^C
Arveja	500	27,38 ± 1,24 ^A	43,70 ± 1,12 ^B	53,09 ± 1,70 ^C
	750	26,76 ± 0,57 ^A	43,49 ± 0,34 ^B	52,98 ± 2,47 ^C
	1 000	26,90 ± 0,72 ^A	43,84 ± 0,96 ^B	52,67 ± 1,64 ^C
Chocho	500	27,75 ± 1,65 ^A	43,95 ± 1,05 ^B	52,61 ± 2,26 ^C
	750	26,83 ± 0,62 ^A	43,45 ± 0,75 ^B	52,69 ± 2,58 ^C
	1 000	26,10 ± 0,76 ^A	44,72 ± 1,75 ^B	51,45 ± 1,65 ^C
Fréjol	500	29,80 ± 3,20 ^A	43,43 ± 0,98 ^B	51,82 ± 1,00 ^C
	750	27,00 ± 0,61 ^A	44,10 ± 0,97 ^B	52,65 ± 1,75 ^C
	1 000	27,22 ± 0,79 ^A	43,34 ± 0,88 ^B	54,20 ± 1,44 ^C
Sangorache	500	27,20 ± 1,18 ^A	44,41 ± 0,85 ^B	52,89 ± 1,44 ^C
	750	27,14 ± 0,92 ^A	43,82 ± 1,03 ^B	53,57 ± 1,07 ^C
	1 000	26,71 ± 0,62 ^A	43,30 ± 1,12 ^B	52,81 ± 2,72 ^C

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 6)

Letras distintas en la misma columna señalan diferencias estadísticas significativas (p < 0,05)

El método inicial que se usó indica que el volumen de enzima y extracto es 500 μL. En el diseño experimental propuesto se colocaron cantidades mayores, con respecto a la cantidad indicada en el experimento, tanto de enzima como de extracto, para que esta modificación no altere el volumen final en el ensayo, se disminuyó en igual cantidad el tampón fosfato de sodio.

Como se observa en la Tabla 3.6, al aumentar el volumen de enzima en la experimentación aumenta la actividad proteolítica de CPA; sin embargo, para los tres volúmenes de enzima, el análisis estadístico demuestra que no existen

diferencias estadísticas significativas al mantener constante el volumen de la enzima y aumentar el volumen de los cinco extractos ensayados.

De acuerdo con los resultados de esta nueva experimentación, se confirma que no existe inhibición por parte de ninguno de los extractos crudos en la actividad proteolítica de CPA determinada de acuerdo con el método de Becker, Makkar y Siddhuraju (2007, p. 7) modificado, con caseína como sustrato.

Si bien, como ya se indicó, Chávez et al. (2003) y Hernández et al. (2013) encontraron actividad inhibidora de carboxipeptidasa A, en los dos estudios los métodos de obtención de los extractos fueron diferentes a los establecidos en la presente investigación. En el primer caso las fuentes fueron de origen marino y su proceso de obtención y purificación se desarrolló a 4 °C en procesos combinados de precipitación con ácidos y velocidades de centrifugación entre 10 000 y 12 000 × *g*.

En las dos investigaciones en mención se usaron sustratos sintéticos que, según el estudio desarrollado por Kakade, Simons y Liener (1969), en el cual comparan sustratos naturales versus sustratos sintéticos, concluyen que la cantidad de enzima inhibida en el ensayo con un sustrato sintético (como BApNA) es mayor en un 25 a 30 % que la inhibida en el ensayo con un sustrato natural (como caseína, 1 %) (p. 525). En este mismo estudio también se cita el trabajo de Laskowski y Laskowski, en el cual se afirma que la inhibición ensayada con sustratos sintéticos es más sensible a la ensayada con sustratos naturales (p. 526).

Hernández et al. (2013) también determinaron la actividad inhibidora de tripsina y papaína, con las mismas semillas usadas en la presente investigación; los mejores resultados los obtuvieron con sangorache, para tripsina, con un valor de $321,7 \pm 34,6$ mU/mg y con fréjol, para papaína, con un valor de $106,1 \pm 31,2$ mU/mg. La mejor actividad inhibidora para CPA fue encontrada en el extracto de fréjol con un valor de $8,9 \pm 2,6$ mU/mg el cual es, respectivamente, 36 y 12 veces más bajo en comparación a los reportados para tripsina y papaína.

De todo lo antes expuesto, se puede concluir que si bien los resultados de Hernández et al. (2013) contrastan con los encontrados en esta investigación, dichos valores son muy bajos y al parecer no se detectaron en el ensayo desarrollado en este trabajo que usó caseína como sustrato.

3.3. PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO CRUDO CON MAYOR ACTIVIDAD INHIBIDORA FRENTE PAPAÍNA Y QUIMOTRIPSINA

Los extractos crudos de fréjol y chocho presentaron la mayor actividad inhibidora específica para papaína y quimotripsina, respectivamente. Estos extractos fueron seleccionados para la purificación mediante filtración, tratamiento térmico, precipitación con TCA y cromatografía de afinidad.

3.3.1. EVALUACIÓN DE LA PURIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS DE FRÉJOL Y CHOCHO MEDIANTE FILTRACIÓN A 10 kDa

3.3.1.1. Evaluación del permeado y retenido del extracto de fréjol, obtenidos en la ultrafiltración centrífuga a 10 kDa

Luego de la ultrafiltración centrífuga a 10 kDa, se obtuvieron 9,87 mL de permeado y 90 μ L de retenido. Con el retenido fue necesario realizar una dilución 1:45 para contar con el volumen necesario de muestra para determinar la AI, [P] y AIE, frente a papaína, cuyos resultados se indican en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7. AI, [P] y AIE producida por el permeado y retenido del extracto de fréjol, filtrado a 10 kDa, frente a papaína

Tipo de fracción	AI _{papaína} (U/mL)	[P] (mg/mL)	AIE _{papaína} (U/mg)
Extracto crudo	40,95 ± 1,22 ^B	8,28 ± 0,22 ^B	4,95 ± 0,15 ^B
Retenido	86,53 ± 14,34 ^A	56,16 ± 17,63 ^A	1,54 ± 0,26 ^C
Permeado	37,22 ± 2,56 ^C	6,73 ± 0,45 ^C	5,53 ± 0,38 ^A

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 6)

Letras distintas en la misma columna señalan diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$)

Como se observa, la actividad inhibidora y la concentración de proteína son mayores en el retenido que en el permeado y en el extracto crudo; sin embargo, al calcular la actividad inhibidora específica, el permeado y el extracto crudo presentaron valores tres veces mayores al del retenido. En todos los parámetros evaluados existen diferencias significativas entre el extracto crudo, el retenido y el permeado ($p < 0,05$).

Los balances de actividad inhibidora y de cantidad de proteína determinaron un porcentaje de pérdida de 8,4 % para la actividad inhibidora y 13,7 % para la cantidad de proteína; esto se debería a las pérdidas por extracción de material por las condiciones de experimentación y al error experimental. Un ejemplo de cálculo para obtener los porcentajes indicados se presenta en el Anexo IV.

Para el cálculo de la actividad inhibidora y concentración de proteína, en el retenido, se consideró el factor de dilución 1:45. Este factor también influyó directamente en el error experimental, de tal manera que los resultados presentan una alta variabilidad; es así que, para la actividad inhibidora y la concentración de proteína los coeficientes de variación son, respectivamente, 16,57 y 31,40 %, que se consideraron como un parámetro importante al elegir la fracción para las posteriores purificaciones, porque a mayor variabilidad los resultados son menos confiables.

En conclusión, el permeado del extracto de fréjol presentó la mayor AIE frente a papaína, con un grado de purificación de 1,12 veces, con diferencias estadísticas significativas en comparación al retenido y al extracto crudo. Si bien la

concentración de proteína disminuyó de $8,28 \pm 0,22$ a $6,73 \pm 0,45$ (mg/mL), la actividad inhibidora se mantuvo con un valor cercano a la del extracto crudo con $37,22 \pm 2,56$ (U/mL). Estos resultados evidenciaron que la filtración a 10 kDa es favorable en el proceso de purificación. Por lo antes expuesto, se seleccionó al permeado del extracto de fréjol para las posteriores etapas de purificación para nuevamente evaluar la AI, [P] y AIE frente a papaína.

3.3.1.2. Evaluación del permeado y retenido del extracto de chocho, obtenidos en la ultrafiltración centrífuga a 10 kDa

Luego de la ultrafiltración centrífuga del extracto de chocho se obtuvieron 9,44 mL del permeado y 455 μ L de retenido, esta fracción fue diluida con tampón fosfato 50 mM, a pH 7,5 con un factor 1:40, así se obtuvo el volumen necesario para determinar los parámetros evaluados, frente a quimotripsina, que se presentan en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8. AI, [P], y AIE producida por el permeado y retenido del extracto de chocho, filtrado a 10 kDa, frente a quimotripsina

Tipo de fracción	AI _{quimotripsina} (U/mg)	[P] (mg/mL)	AIE _{quimotripsina} (U/mg)
Extracto crudo	$55,00 \pm 1,62^B$	$25,06 \pm 0,14^B$	$2,19 \pm 0,06^B$
Retenido	$103,35 \pm 15,82^A$	$93,14 \pm 14,02^A$	$1,11 \pm 0,17^C$
Permeado	$47,35 \pm 3,06^C$	$17,89 \pm 1,69^C$	$2,64 \pm 0,17^A$

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 6)

Letras distintas en la misma columna señalan diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$)

La filtración del extracto de chocho retuvo un volumen mayor al retenido en la filtración del extracto de fréjol, aunque la experimentación se realizó bajo las mismas condiciones. Esto se debe a las características propias de cada semilla, como la cantidad de proteína y carbohidratos.

Sin embargo, los resultados de actividad inhibidora y concentración de proteína guardan cierta correspondencia entre los extractos de fréjol y chocho, como se

puede notar en las Tablas 3.7 y 3.8; es decir, también el retenido de chocho presentó valores más altos de actividad inhibidora y concentración de proteína.

Como se observa en la Tabla 3.8, la actividad inhibidora del retenido es dos veces mayor que la del extracto crudo y del permeado; la concentración de proteína es aproximadamente cuatro veces más alta. El análisis que se realizó en cuanto al efecto del factor de dilución en los resultados para el retenido de fréjol, es también aplicable para el retenido de chocho, es así que los coeficientes de variación superan el 15 %.

Se encontró que los porcentajes de pérdida de actividad inhibidora y cantidad de proteína fueron 12,43 y 15,5 % respectivamente. Esto se debe a las pérdidas propias de la experimentación, que por ser a escala de laboratorio son muy altas, y al error experimental en la determinación de los parámetros evaluados. Un ejemplo de cálculo de los balances de AI y cantidad de proteína se presenta en la Anexo AIV.

Echeverría (2014) también determinó la concentración de proteína del permeado y retenido a 10 kDa del extracto de chocho y reporta para el permeado un valor de $15,01 \pm 1,39$ mg/mL y para el retenido un valor de $89,25 \pm 5,88$ mg/mL; estos valores fueron determinados mediante el método de absorbancia en el ultravioleta (pp. 55, 61). En el presente trabajo se obtuvieron para el permeado un valor de $17,89 \pm 1,69$ mg/mL, y para el retenido un valor de $93,14 \pm 14,02$ mg/mL, estas concentraciones de proteína fueron determinadas mediante el método de Biuret. Si bien, los métodos en las dos investigaciones son diferentes, concuerdan en la relación que existe entre la concentraciones del permeado y retenido.

El permeado de chocho presentó la mayor AIE, con un grado de purificación de 1,21 veces, con diferencias estadísticas significativas en comparación al extracto crudo y el retenido. Este resultado se debe a que la actividad inhibidora en el permeado disminuyó en un 13,90 %; mientras que, la concentración de proteína disminuyó en un 28,61 %, entonces el coeficiente de estos dos parámetros aumentó, con relación al extracto crudo. En conclusión, se seleccionó al

permeado de chocho para las siguientes etapas de purificación, en las que también se evaluarán la AI, [P] y AIE, frente a quimotripsina.

3.3.2. PURIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS SELECCIONADOS, MEDIANTE TRATAMIENTO TÉRMICO

Los extractos crudos de fréjol y chocho fueron sometidos a un proceso de ultrafiltración centrífuga en una membrana de 10 kDa, luego del análisis de los resultados, que se detallaron en la sección anterior, se determinó que en los dos casos los permeados presentaron mayor actividad inhibidora específica. El permeado de fréjol, con un valor de $5,53 \pm 0,38$ U/mg frente a papaína y el permeado de chocho, con un valor de $2,64 \pm 0,17$ U/mg frente a quimotripsina, de tal manera que los dos permeados se sometieron a un proceso térmico, de acuerdo con el procedimiento desarrollado por Muñoz (2011, p. 30-31).

Los resultados de la AI, [P], AIE del sobrenadante de cada extracto que se determinó la frente a su respectiva enzima, así como el análisis estadístico se presentan en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9. AI, [P], AIE de los permeados de los extractos de fréjol frente a papaína y chocho frente a quimotripsina, antes y después del tratamiento térmico

Permeado	Tipo de fracción	AI (U/mL)	[P] (mg/mL)	AIE (U/mg)
Fréjol frente a papaína	Antes del tratamiento térmico	$37,22 \pm 2,56^B$	$6,73 \pm 0,45^B$	$5,53 \pm 0,38^C$
	Después del tratamiento térmico	$34,30 \pm 3,01^C$	$2,38 \pm 0,11^D$	$14,41 \pm 1,26^A$
Chocho frente a quimotripsina	Antes del tratamiento térmico	$47,35 \pm 3,06^A$	$17,89 \pm 1,69^A$	$2,64 \pm 0,17^D$
	Después del tratamiento térmico	$31,22 \pm 2,59^D$	$4,72 \pm 0,23^C$	$6,61 \pm 0,55^B$

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

Letras distintas en la misma columna señalan diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$)

La actividad inhibidora de fréjol frente a papaína y de chocho frente a quimotripsina disminuyó luego del tratamiento térmico en un 7,84 y 34,06 %,

respectivamente. Esta disminución se debe al efecto que produce la temperatura en los inhibidores. Según afirman Brenes y Brenes (1993), la termolabilidad de los inhibidores de proteasas depende de su origen; aunque también señalan que para causar una disminución entre el 80 y 100 % en la actividad inhibidora procedente de leguminosas, por lo general, es necesaria una temperatura de 121 °C, por un tiempo mayor a 15 min o un tratamiento térmico equivalente (p. 10).

El procedimiento con calor se justifica si el porcentaje de disminución de la concentración de proteína es mayor al de disminución de AI, de este modo aumenta la AIE y por consiguiente el grado de purificación.

Los resultados que se presentan en la Tabla 3.9 muestran tal comportamiento. En los permeados de fréjol y chocho tratados con calor se obtiene una disminución en la concentración de proteína del 64,63 y 73,61 %, respectivamente, y pese a tener una disminución en la AI, presentan un aumento en la AIE en comparación con la reportada para los extractos permeados sin tratamiento térmico, con un grado de purificación de 2,61 y 2,50 veces; es decir, existen diferencias estadísticas significativas entre la AIE antes y después del tratamiento térmico.

En conclusión, el tratamiento térmico favorece el proceso de purificación de los inhibidores de papaína y quimotripsina obtenidos de las semillas de fréjol y chocho. Así también lo confirman estudios realizados por Chávez et al., 2011, quienes aplican un tratamiento térmico en la búsqueda de inhibidores de proteasas en extractos de cinco especies de ascidias de las costas cubanas, los cuales presentaron clarificados con mayor actividad inhibidora de tripsina, después del tratamiento térmico (p.78).

3.3.3. PURIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS SELECCIONADOS, MEDIANTE PRECIPITACIÓN CON ÁCIDO TRICLORO ACÉTICO (TCA)

En el proceso de purificación de los inhibidores de papaína y quimotripsina provenientes de los extracto de fréjol y chocho, respectivamente, luego del

tratamiento térmico el sobrenadante que se obtuvo se sometió a un proceso de precipitación con TCA al 4 %, con el fin de eliminar proteínas que no son de interés y que no hayan precipitado con el tratamiento térmico.

Luego de que se adicionó, gota a gota, una solución de TCA, al 20 %, a los extractos semipurificados hasta alcanzar la concentración final del 4 % de TCA, en la mezcla se notó un cambio de color, de transparente a marrón, principalmente en el extracto de fréjol.

No se observó, a simple vista, ningún precipitado; sin embargo, se centrifugó a $2\ 800 \times g$ y en la aparente fracción sobrenadante se determinó la concentración de proteína mediante el método de Biuret, que se detalló en la sección 2.2.3.2, para verificar primero si existió precipitación de proteínas; y luego, a través de la determinación de la AI, establecer si las proteínas de interés continúan suspendidas en la solución.

En la Tabla 3.10, se muestran los resultados obtenidos y el análisis estadístico que se desarrolló mediante el test de rangos múltiples con un nivel del 95 % de confianza, en el programa Statgraphics Centurion XV, para determinar la desviación estándar y las diferencias estadísticas significativas entre las medias.

Tabla 3.10. Concentración de proteína en los extractos semipurificados de fréjol y chocho, antes y después del tratamiento con TCA al 4 %

Extractos semipurificados	Tipo de fracción	[P] (mg/mL)
Fréjol	Antes del tratamiento con TCA	$2,38 \pm 0,11^B$
	Después del tratamiento con TCA	$2,29 \pm 0,08^B$
Chocho	Antes del tratamiento con TCA	$4,72 \pm 0,23^A$
	Después del tratamiento con TCA	$4,58 \pm 0,16^A$

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

Letras distintas en la misma columna señalan diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$)

De acuerdo con el análisis estadístico, no existen diferencias estadísticamente significativas en la concentración de proteína de los dos extractos semipurificados antes y después del tratamiento con TCA.

Estos resultados difieren con los obtenidos por Muñoz (2011), quien ensayó este tratamiento, con los mismos extractos de fréjol y chocho, y encontró diferencias estadísticas significativas en la concentración de proteína medida antes y después del tratamiento con TCA (p. 54). Es importante indicar que Muñoz (2011) analizó de manera independiente el efecto del tratamiento térmico y el tratamiento con TCA sobre los extractos crudos y no de manera consecutiva, como se realizó en el presente trabajo. Además, en el presente trabajo se realizó una etapa previa de desengrasado, que pudo influenciar en el resultado del tratamiento térmico.

Pese a no obtener diferencias significativas en la concentración de proteína, se procedió a retirar el TCA de la fracción sobrenadante, mediante cromatografía de exclusión por tamaño, (también conocida como filtración en gel) a través de una columna PD-10 preempacada, de acuerdo con el método descrito por Muñoz (2011, p. 32), para luego evaluar la actividad inhibidora.

Para comprobar que el TCA se retiró completamente de las fracciones obtenidas, se determinó el pH, porque la disminución de la IA puede provocarse por una caída en el valor de pH y no por los inhibidores objetivo de este estudio.

En la Tabla 3.11 se muestran los resultados de la concentración de proteína y el pH de las fracciones, obtenidas mediante la filtración en gel de los extractos semipurificados de fréjol y chocho, sometidos al proceso de precipitación con TCA, así como también el respectivo análisis estadístico.

Tabla 3.11. Concentración de proteína y pH de las fracciones obtenidas mediante la filtración en gel de los extractos de fréjol y chocho

Fracción	Permeados semipurificados Fréjol		Permeados semipurificados Chocho	
	[P] (mg/mL)	pH	[P] (mg/mL)	pH
1	0,008 ± 0,001 ^E	7	0,024 ± 0,019 ^F	6
2	0,448 ± 0,029 ^B	6	0,678 ± 0,001 ^C	5
3	1,028 ± 0,023^A	2	2,133 ± 0,012^A	2
4	0,272 ± 0,007 ^C	5	1,680 ± 0,080 ^B	2
5	0,070 ± 0,005 ^D	7	0,376 ± 0,051 ^D	4
6	0,023 ± 0,002 ^E	7	0,102 ± 0,015 ^E	6
7	0,011 ± 0,001 ^E	7	0,041 ± 0,004 ^F	6

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

Letras distintas en la misma columna señalan diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$)

Como se observa, en las fracciones dos, tres y cuatro se obtuvieron las mayores concentraciones de proteína, para los dos extractos; pero, también se mantienen valores de pH ácidos. En una cromatografía de exclusión se esperaría tener valores de pH ácidos en las fracciones seis y siete; es decir, que primero pasen las proteínas, por tener mayor tamaño y luego el ácido; sin embargo, este comportamiento no se observa en la Tabla 3.11, de tal manera que el TCA no fue separado de los extractos. Este fenómeno puede deberse a una interacción entre las proteínas y el TCA, que no permitió su separación mediante este sistema físico.

Si las muestras presentan valores de pH fuera del rango de trabajo de las proteasas, se dificulta la determinación de la AI. El valor de pH para las enzimas ensayadas se indica en la Tabla 2.2. La actividad proteolítica de las enzimas se verá significativamente afectada por el pH y la pérdida de AI que se determine en estas condiciones no será provocada por la inhibición con el extracto, sino por la inactivación con el ácido. La caseína (sustrato) en medios fuertemente ácidos, precipita inmediatamente, por desnaturalización.

Es posible neutralizar los extractos con la adición de una solución básica, para reemplazar la filtración en gel. Algunos autores, como Chávez et al. (2011), ajustaron a pH 7,0 el sobrenadante con una solución de NaOH 1 M, tras aplicar la precipitación de proteínas con TCA (p. 78). Este procedimiento, al parecer, soluciona el problema de acidez en los extractos pero, a su vez, acarrea otro, la formación de sales en los extractos, que interfieren en las lecturas espectrofotométricas y dificulta su caracterización, por ejemplo al determinar su peso molecular ya sea por electroforesis o espectrometría de masas (Havlíček y Novák, 2013, p. 88).

Si bien, en las investigaciones anteriores a este trabajo Muñoz (2011) y Echeverría (2014) aplicaron una cromatografía de exclusión por tamaño para retirar el TCA de las fracciones, no determinaron el pH de cada fracción para probar la eficiencia de la columna.

Bajo las condiciones que se establecieron en este trabajo, el método de precipitación de proteínas con TCA no es apropiado. La concentración final de TCA (4 %) que se usó en el ensayo fue 5 veces menor a la recomendada por Sigma-Aldrich Corporation (2006) para precipitar proteínas de peso molecular inferior a 20 kDa. Sin embargo, a mayores concentraciones de TCA el procedimiento para retirarlo es aún más complejo (Chávez et al., 2011, p. 78).

En definitiva, en el proceso de purificación de los extractos inhibidores de fréjol frente a papaína y chocho frente a quimotripsina, por el análisis antes expuesto, no se considera adecuado aplicar el tratamiento de precipitación con TCA. Para la siguiente etapa de purificación se seleccionaron los permeados de la membrana de 10 kDa tratados a 60 °C, durante 30 min.

3.3.4. PURIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

3.3.4.1. Cromatografía de afinidad del permeado (<10 kDa) de las semillas de fréjol y evaluación de la actividad inhibidora frente a papaína

En la Figura 3.1 se presenta el cromatograma de la purificación selectiva del permeado (< 10 kDa) semipurificado (con tratamiento térmico) de las semillas de fréjol.

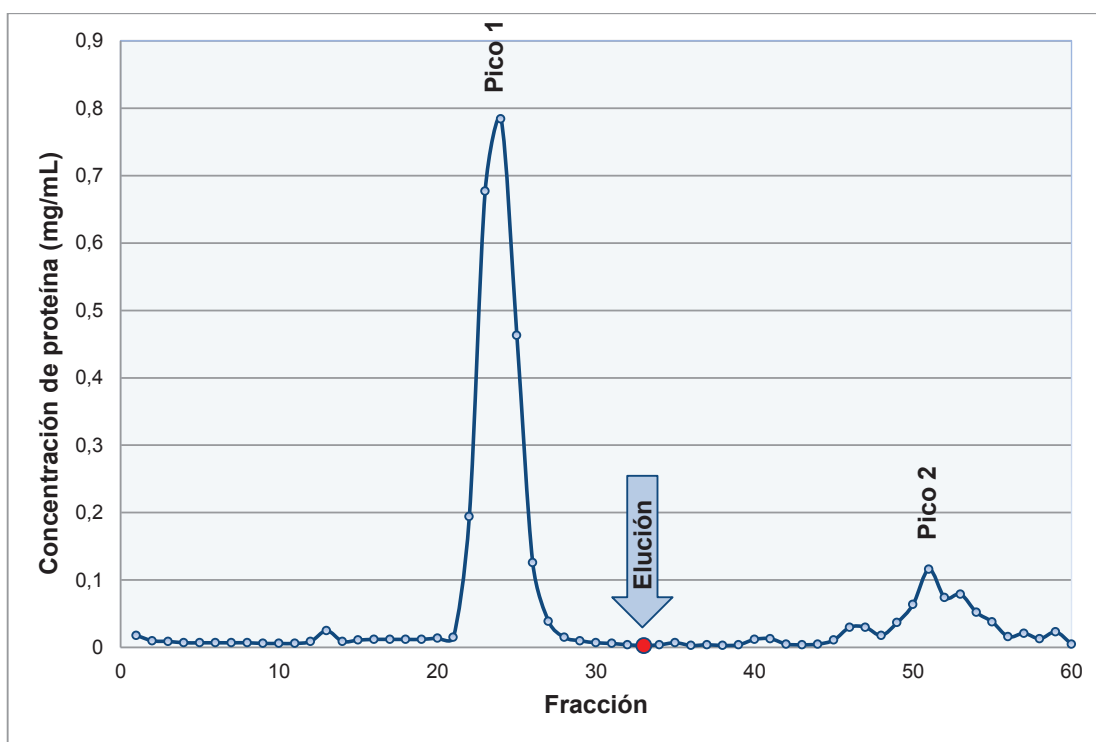


Figura 3.1 Cromatograma del permeado (< 10 kDa) semipurificado de la semilla de fréjol

Luego de alimentar la columna con 5 mL del extracto semipurificado de fréjol, se recolectaron las 60 fracciones, que se presentan en el cromatograma de la Figura 3.1. Se observa un primer pico, desde la fracción 22 hasta la 27, que corresponde a las proteínas que no se fijaron a la matriz, con un valor máximo de concentración de proteína de 0,784 mg/mL, en la fracción 24.

A partir de la fracción 29 se obtuvieron concentraciones de proteína cercanas a cero; cuando se recolectaba la fracción 33 se alimentó la solución ácida de elución (KCl-HCl, 1 M, pH 1,9). Luego se obtuvo un segundo pico, desde la fracción 48 hasta la 56, que contiene las proteínas que fueron eluidas y recolectadas; este segundo pico presenta una concentración máxima de proteína de 0,116 mg/mL, en la fracción 51.

El proceso cromatográfico provoca la dilución de la muestra; puesto que el extracto de fréjol alimentado en la columna tuvo una concentración de proteína igual a $2,38 \pm 0,11$ mg/mL, que comparado con los valores máximos de los dos picos, es 3 veces mayor al primero y 20 veces mayor al segundo.

Los resultados de la AI frente a papaína de las fracciones recolectadas en la purificación selectiva, del extracto semipurificado de fréjol, se muestran en la Figura 3.2.

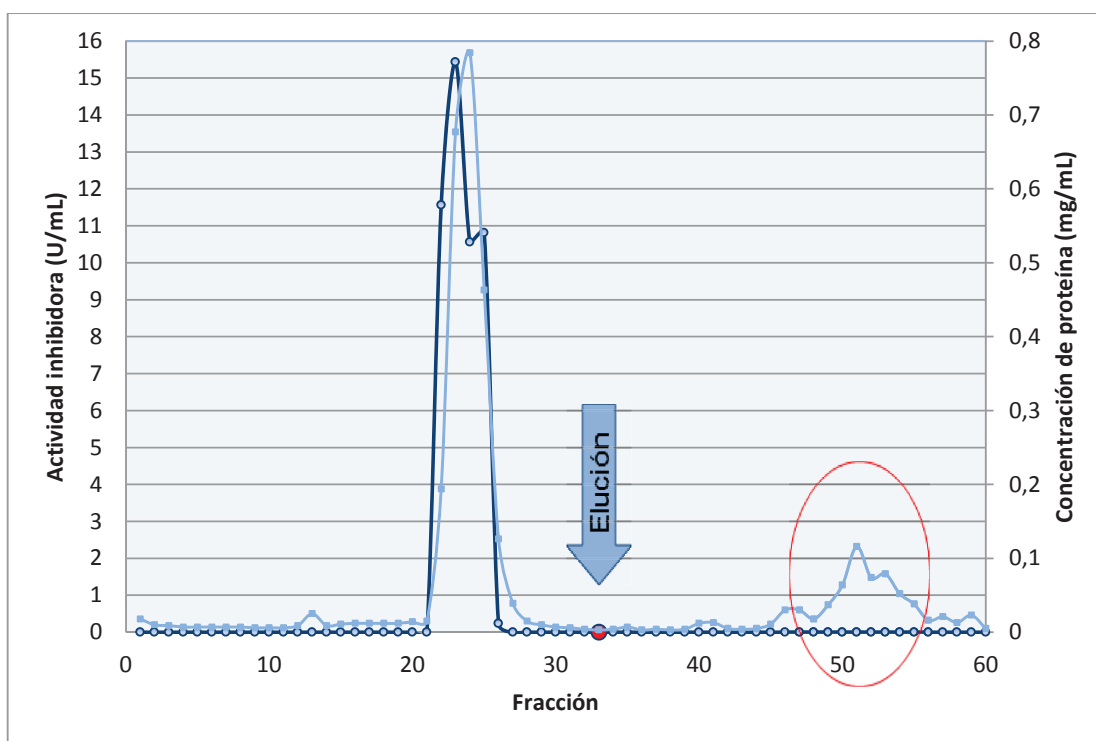


Figura 3.2 AI de las fracciones obtenidas en la purificación selectiva del extracto de la semilla de fréjol frente a papaína

Según estos resultados, se obtuvo AI, frente a papaína, en las fracciones 22, 23, 24 y 25 que corresponden al primer pico de la Figura 3.1. Mientras que, en las fracciones del segundo pico del cromatograma no se detectó AI.

De acuerdo con el fundamento de la cromatografía de afinidad se esperaría que las proteínas del primer pico cromatográfico no presenten actividad inhibidora; mientras que, las proteínas del segundo pico, que se fijaron a la matriz, si presenten actividad inhibidora; sin embargo, el comportamiento que se observa en la Figura 3.2 muestra lo contrario.

La diferencia de la concentración de proteína entre los dos picos del cromatograma puede ser efecto del bajo porcentaje de retención de actividad funcional (20,58 %) que presenta la matriz; es decir, a la dificultad que tienen los inhibidores para fijarse a la enzima inmovilizada (tripsina) (Arroyo, 1998, p. 30).

El hecho de no obtener actividad inhibidora en el segundo pico, puede deberse a que los inhibidores presentes son de espectro específico, es decir que, presentan AI frente a tripsina pero no frente a papaína.

Del análisis antes expuesto, se puede concluir que se produjo una purificación indirecta en el primer pico, el cual registra un valor AIE igual a 21,65 U/mg, que representa un grado de purificación de 1,5 veces, en un volumen total de 15 mL.

3.3.4.2. Cromatografía de afinidad del permeado (<10 kDa) de las semillas de chocho y evaluación de la actividad inhibidora frente a quimotripsina

En la Figura 3.3 se presenta el cromatograma de la purificación selectiva del permeado (< 10 kDa), que se purificó con tratamiento térmico, de las semillas de chocho.

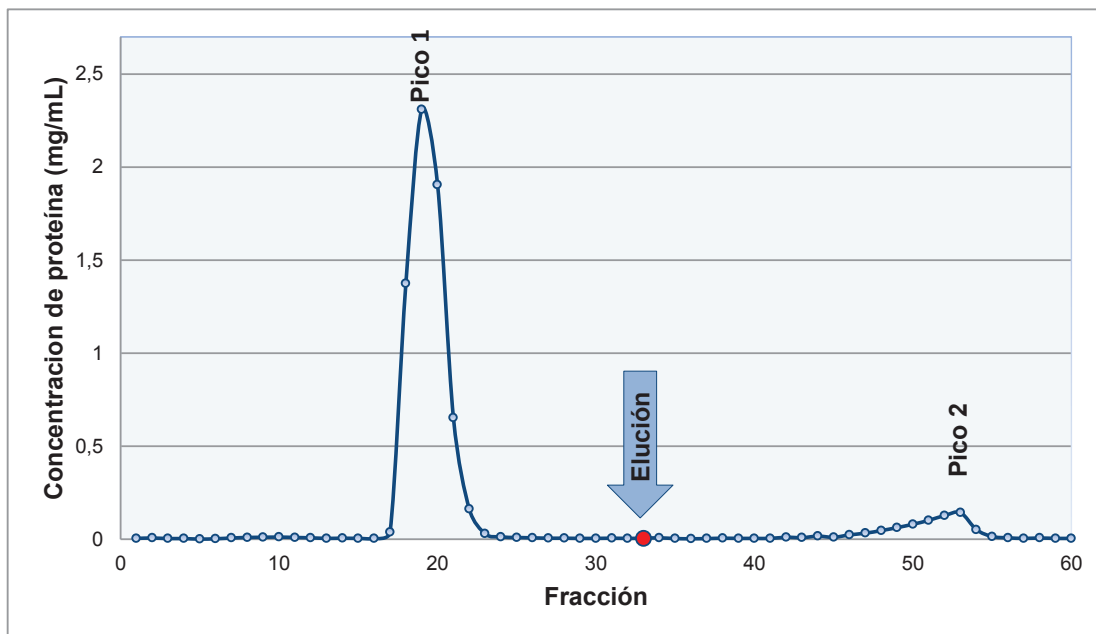


Figura 3.3 Cromatograma del permeado (< 10 kDa) semipurificado de la semilla de chocho

Como se puede observar, el cromatograma de la purificación selectiva del permeado de chocho, al igual que el cromatograma del permeado de fréjol (Figura 3.1), presenta dos picos. El primer pico se forma desde la fracción 18 a la 22, que corresponde a las proteínas que no se fijaron a la matriz, con un valor máximo de concentración de proteína de 2,31 mg/mL, en la fracción 19.

Luego de alimentar la solución ácida de elución (KCl-HCl, 1 M, pH 1,9), se generó el segundo pico desde la fracción 48 a la 54, con un valor máximo de concentración de proteína de 0,143 mg/mL, en la fracción 53.

Este proceso cromatográfico también provocó la dilución de la muestra que se alimentó (4,72 mg/mL), en comparación a los valores máximos que se obtuvieron en los dos picos, en especial con el segundo pico (0,143 mg/mL), que es 33 veces más bajo.

Los resultados de la actividad inhibidora frente a quimotripsina de las fracciones recolectadas en la purificación selectiva del extracto semipurificado de chocho se muestran en la Figura 3.4.

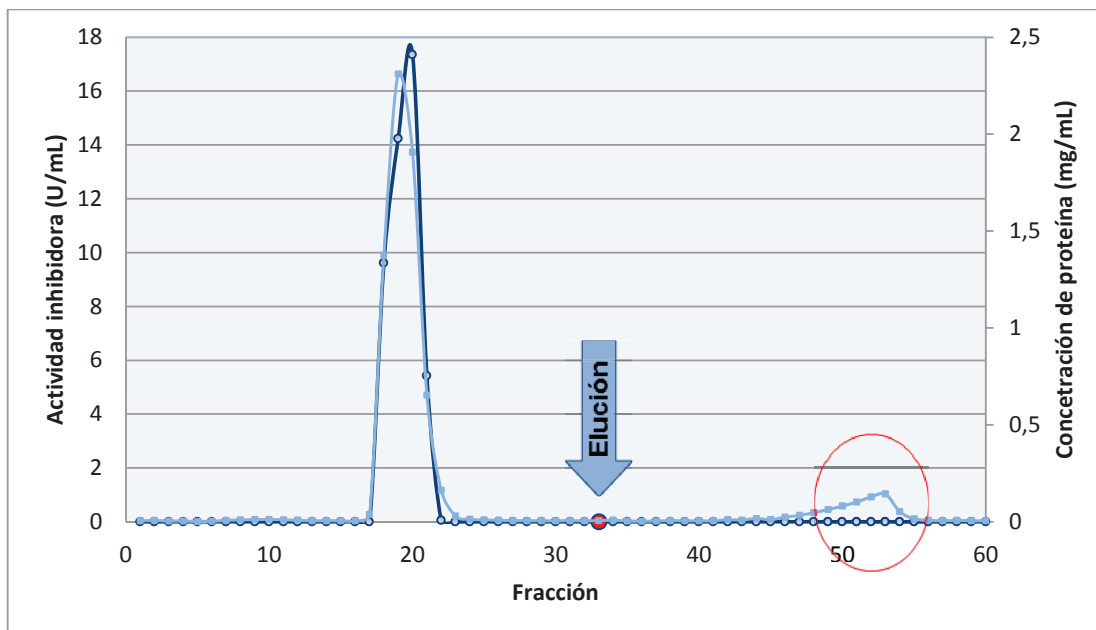


Figura 3.4 Actividad inhibidora de las fracciones obtenidas en la purificación selectiva del extracto de la semilla de chocho frente a quimotripsina

Según los resultados que se muestran, se encontró actividad inhibidora de quimotripsina en las fracciones 18, 19, 20 y 21, las mismas que forman el primer pico del cromatograma, que se indica en la Figura 3.3, y corresponden al grupo de proteínas que no se fijaron a la matriz.

Las proteínas que forman el segundo pico en el cromatograma de la Figura 3.3, es decir aquellas que se fijaron a la matriz, no presentan actividad inhibidora frente a quimotripsina, bajo las condiciones establecidas para este ensayo.

En esta cromatografía así como en la del extracto de fréjol, se produjo una purificación indirecta en el primer pico, el cual registra un valor AIE igual a 7,46 U/mg, que representa un grado de purificación de 1,13 veces, en un volumen total de 12 mL.

Pese a lograr una purificación indirecta en la cromatografía de afinidad, los extractos de fréjol y chocho se diluyeron 3 y 2,4 veces, respectivamente. Razón

por la cual no se utilizaron dichos extractos en las etapas posteriores de purificación, sino aquellos que se obtuvieron después del tratamiento térmico.

3.4. EVALUACIÓN DE LOS EXTRACTOS SEMIPURIFICADOS, CONCENTRADOS MEDIANTE EVAPORACIÓN

Los extractos semipurificados de fréjol y chocho fueron concentrados en un rotavapor, según las especificaciones que se detallan en la sección 2.4.2. Los resultados se muestran en la Tabla 3.12.

Tabla 3.12. AI, [P] y AIE de los permeados de los extractos de fréjol frente a papaína y chocho frente a quimotripsina, antes y después de la concentración por evaporación

Permeado semipurificado	Tipo de fracción	Volumen (mL)	AI (U/mL)	[P] (mg/mL)	AIE (U/mg)
Fréjol frente a papaína	Antes del tratamiento	8,00	34,30 ± 3,01 ^C	2,38 ± 0,11 ^D	14,41 ± 1,26 ^A
	Después del tratamiento	2,34 ± 0,22	97,04 ± 8,62 ^B	7,49 ± 0,56 ^B	13,00 ± 1,15 ^B
Chocho frente a quimotripsina	Antes del tratamiento	7,00	31,22 ± 2,59 ^D	4,72 ± 0,23 ^C	6,61 ± 0,55 ^C
	Después del tratamiento	1,57 ± 0,14	123,68 ± 11,48 ^A	17,83 ± 1,02 ^A	6,94 ± 0,64 ^C

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

Letras distintas en la misma columna señalan diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$)

La evaporación produjo una reducción en el volumen de las muestras de 3,5 veces para fréjol y 4,0 veces para chocho, esta reducción a su vez concentró la proteína en la misma relación.

La AIE que se determinó antes y después del tratamiento disminuyó en un 9,78 %, para el permeado de fréjol, con diferencias estadísticas significativas; mientras que, la AIE con el extracto de chocho no presentó diferencias estadísticas significativas.

Se aplicó este procedimiento porque la concentración de proteína en los permeados semipurificados era menor a 5 mg/mL. Esta es la concentración mínima recomendada para la posterior determinación del peso molecular mediante electroforesis (Lomonte, 2002, p. 98); luego de la concentración fue necesario determinar la AI y la AIE, para verificar que el tratamiento calórico no disminuya significativamente estos parámetros.

En estudios anteriores, como los desarrollados por Chávez (2008, p. 3) y Hernández (2009, p. 1), se obtuvieron extractos con actividad inhibidora enzimática, también aplicaron un tratamiento de concentración por evaporación, como un proceso previo a la liofilización, con temperaturas y tiempos que no sobrepasaron los 60 °C y 5 min. Bajo estas condiciones concentraron la proteína y no obtuvieron diferencias significativas en la AI. Estos resultados concuerdan con los que se determinaron en este estudio, en cuanto a que no existe disminución considerable de AI luego de aplicar este tipo de tratamiento calórico.

3.5. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA FRACCIÓN INHIBIDORA MÁS ACTIVA FRENTE A PAPAÍNA Y QUIMOTRIPSINA

La caracterización bioquímica se realizó a los extractos de fréjol y chocho que se obtuvieron luego del tratamiento térmico (60 °C, 30 min), los mismos que fueron concentrados mediante evaporación. Se determinaron los pesos moleculares, los tipos de inhibición y los valores de IC₅₀.

3.5.1. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE LA FRACCIÓN INHIBIDORA MÁS ACTIVA FRENTE A PAPAÍNA Y QUIMOTRIPSINA

Se realizó una corrida electroforética (SDS-PAGE) previa, de los extractos crudos de fréjol y chocho, mediante el método descrito por Félix (2008, pp. 43-46).

En la Figura 3.5 se muestra una fotografía del gel (al 15 % de poliacrilamida), luego del proceso de revelado, en el cual se aprecian las bandas de los tres carriles que corresponden (1) al extracto crudo de fréjol, (2) al estándar y (3) al extracto crudo de chocho, respectivamente.

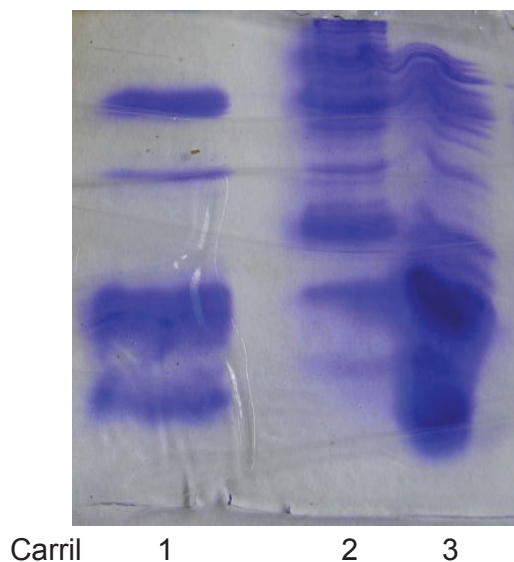


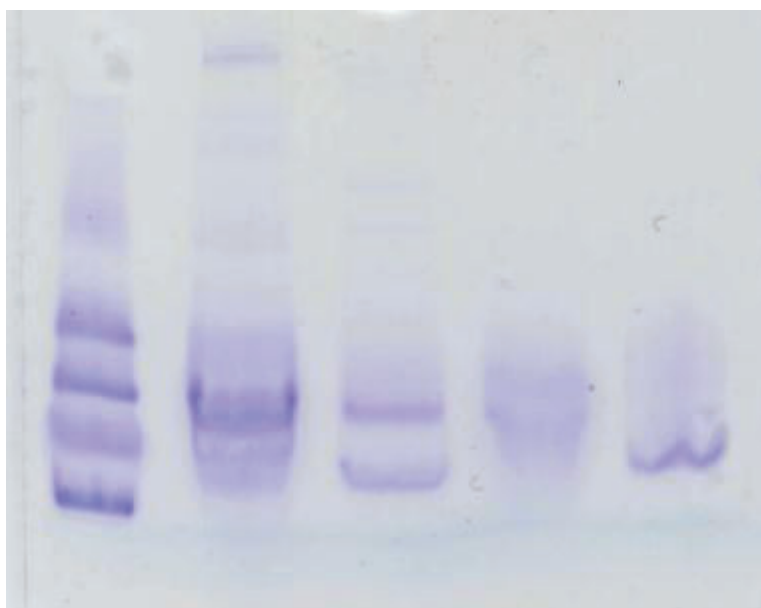
Figura 3.5 Gel de la electroforesis de los extractos crudos de fréjol y chocho

En el gel de la electroforesis se observan bandas juntas, no muy bien definidas especialmente en el tercer carril, que corresponde al extracto de chocho. Este resultado muestra la variedad proteica que tienen las muestras, que mediante una comparación cualitativa con el estándar (carril 2) se estiman proteínas en los extractos en estudio con pesos moleculares entre 4 y 180 kDa. Esta corrida previa se realizó para luego compararla con la corrida con los extractos purificados y evaluar así la eficiencia en el proceso de purificación.

Por otra parte, se determinó el peso molecular de los inhibidores presentes en los extractos semipurificados mediante electroforesis (SDS-PAGE), según el método desarrollado por Laemmli (1970), que se detalla en el acápite 2.4.3.1.

En la Figura 3.6 se muestra el gel de poliacrilamida al 20 % obtenido en la electroforesis del estándar y los extractos semipurificados de fréjol y chocho.

Al 20 % de poliacrilamida, se obtuvieron bandas bien definidas y distribuidas a lo largo del gel. Esta concentración concuerda con algunas fuentes bibliográficas que recomiendan concentraciones mayores al 15 % de poliacrilamida para proteínas de bajo peso molecular (Lomonte, 2002, p. 95).



Carril 1 2 3 4 5

Figura 3.6 Gel de la electroforesis de los extractos semipurificados de fréjol y chocho

Como se puede observar en el gel de electroforesis, existen 5 carriles, el primer carril corresponde al estándar de pesos moleculares entre 2,56 y 17,20 kDa; el segundo y tercer carril corresponden a los extractos de chocho y fréjol respectivamente, luego del proceso de concentración por evaporación; y los carriles cuatro y cinco pertenecen a los mismo extractos antes del proceso de concentración por evaporación.

Los extractos de chocho y fréjol presentaron bandas más definidas en los carriles dos y tres, respectivamente, en comparación a las que aparecen en los carriles cuatro y cinco; de esta manera se evidenció la necesidad de concentrar las muestras antes del ensayo electroforético, para llegar a la concentración de proteína mínima recomendada (5 mg/mL) (Lomonte, 2002, p. 98).

Al contrastar las gráficas 3.5 y 3.6, que corresponden a las corridas electroforéticas de los extractos crudos y purificados, respectivamente, se puede apreciar la notable disminución de las bandas; es decir que la estrategia de purificación propuesta en el presente trabajo fue favorable en el proceso de obtención de inhibidores purificados de papaína y quimotripsina.

En la Figura 3.7 se muestra la distancia total del frente electroforético así como las distancias recorridas por las bandas de las proteínas del estándar y las proteínas de los extractos semipurificados de chocho y fréjol; el cálculo para la determinación del peso molecular se realizó con las bandas de los carriles 2 y 3, por ser más definidas con relación a las bandas de los carriles 4 y 5.

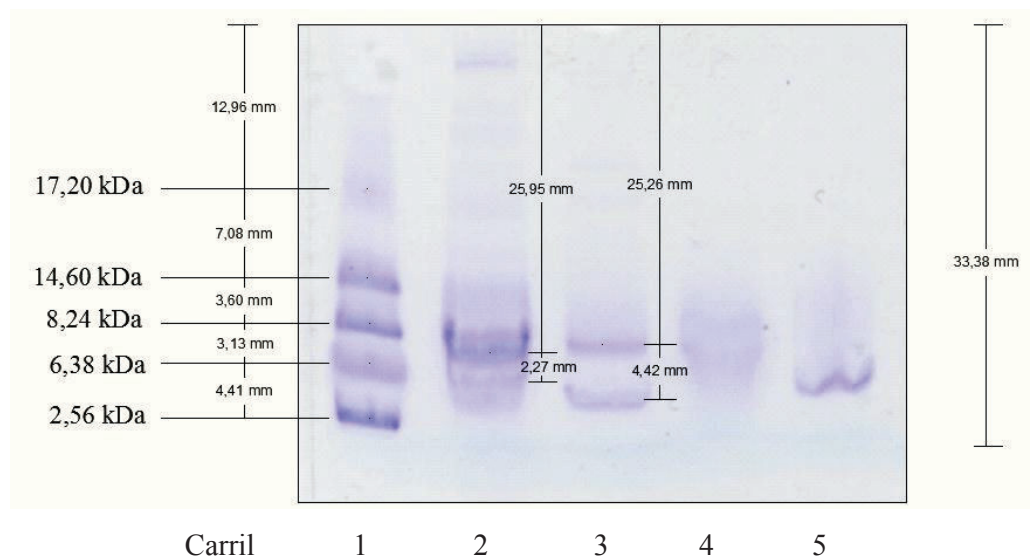


Figura 3.7 Movilidad total del frente electroforético, 1) del estándar y de las muestras en el gel de la electroforesis de los extractos semipurificados de 2) chocho y 3) fréjol

La Figura 3.7 muestra las distancias recorridas por las cinco bandas del estándar, así como también la movilidad de las bandas que se observan en los carriles 2 y 3, correspondientes a los extractos de chocho y fréjol, respectivamente. El frente electroforético presentó una movilidad total de 33,38 mm.

Con los datos calculados de la movilidad relativa, que se presentan en la Tabla AV.1 del Anexo V, se construyó el gráfico del peso molecular versus la movilidad relativa de las bandas del estándar que se muestra en la Figura AV.1 del Anexo

V; además, se muestra la tendencia, que se ajusta a una curva de tipo lineal, con un valor de R^2 igual a 0,95.

Los extractos de chocho y fréjol presentaron dos bandas, cada uno con movilidades relativas, respectivamente, de 0,78, 0,85 y 0,76, 0,89; cuyos valores fueron reemplazados en la ecuación lineal de la curva de calibración.

De este modo, se determinaron los pesos moleculares aproximados para las dos bandas del extracto semipurificado de chocho, con valores de 7,16 kDa para la primera y 5,18 kDa, para la segunda. De igual manera, para las dos bandas del extracto semipurificado de fréjol con valores de 7,72 kDa para la primera y 4,05 kDa para la segunda. El ejemplo de cálculo de estos pesos moleculares se muestra en el Anexo V.

Si bien, en la electroforesis de los dos extractos se observan dos bandas en cada uno, el peso molecular más probable, para los inhibidores en estudio, corresponde a la segunda banda, en cada caso; es decir, 5,18 kDa para el inhibidor de chocho y 4,05 kDa para el de fréjol.

Hernández et al. (2013) determinaron el peso molecular de inhibidores obtenidos de extractos de semillas de fréjol y chocho de las mismas variedades usadas en esta investigación, mediante la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF. Los espectrogramas que obtuvieron se muestran en las Figuras 3.8 y 3.9. Se observan dos picos más prominentes, en cada espectrograma, con diferentes abundancias; sin embargo, se atribuye el peso molecular del inhibidor al pico más alto por ser el de mayor abundancia.

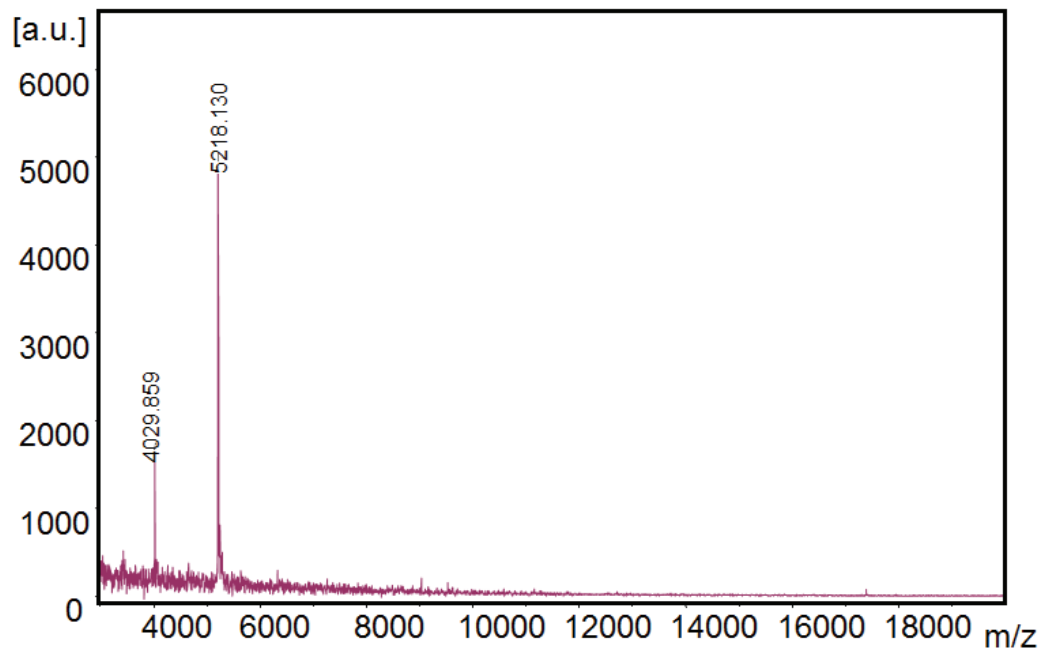


Figura 3.8 Espectrograma obtenido en la espectrometría de masas MALDI-TOF con el extracto de fréjol (*Phaseolus vulgaris*) (Hernández et al., 2013)

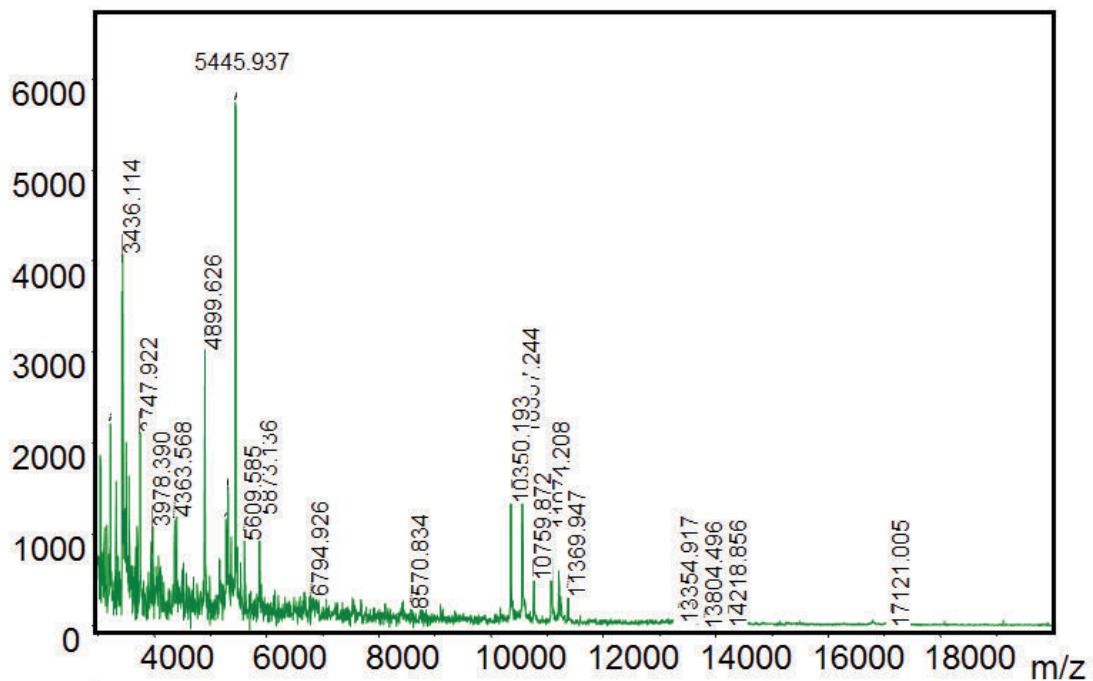


Figura 3.9 Espectrograma obtenido en la espectrometría de masas MALDI-TOF con el extracto de chocho (*Lupinus mutabilis*) (Hernández et al., 2013)

Según los espectrogramas de las Figuras 3.8 y 3.9, Hernández et al. (2013) determinaron que los inhibidores de papaína provenientes de los extractos de fréjol y chocho tienen pesos moleculares de 5,22 y 5,45 kDa. El peso molecular del extracto de fréjol determinado en el presente estudio difiere en un 22 % con el encontrado por Hernández et al. (2013); mientras que, el peso molecular de chocho difiere en un 5 %.

Las diferencias en los resultados se pueden atribuir al margen de error que presenta el ensayo electroforético, especialmente con el extracto de fréjol. Lomonte (2002) señala que la determinación del peso molecular de proteínas según este método tiene un margen de error considerable, debido a la complejidad en la ejecución, así como también a las características propias de las proteínas en experimentación, por ejemplo, proteínas con carga intrínseca tan fuerte, que puede influenciar en el desplazamiento de las bandas a lo largo del gel (p. 92).

También se puede observar en los espectrogramas otros picos de menor abundancia, que en su mayoría tienen pesos moleculares menores a 10 kDa. Este resultado confirma la correcta selección del permeado obtenido en la filtración a 10 kDa, para las subsiguientes etapas de purificación; y a su vez se evidencia la necesidad de realizar una filtración adicional con una membrana menor a 3 kDa, para obtener extractos más concentrados.

3.5.2. DETERMINACIÓN DEL VALOR DE IC_{50} DE LA FRACCIÓN INHIBIDORA MÁS ACTIVA DE PAPAÍNA Y QUIMOTRIPSINA

Para calcular el valor de IC_{50} de los extractos semipurificados de fréjol y chocho, se determinó la actividad proteolítica de papaína y quimotripsina, en presencia y ausencia de inhibidor y se determinaron los parámetros cinéticos K_m y $V_{máx}$.

3.5.2.1. Cálculo del IC_{50} del extracto semipurificado de fréjol frente a papaína

Se determinó el valor de IC_{50} con el extracto semipurificado de fréjol, que se obtuvo luego del proceso de concentración por evaporación. Para el cálculo de K_m y $V_{máx}$ se determinó la actividad proteolítica de papaína, sin inhibidor y con 3 soluciones del extracto inhibidor de 1, 3 y 7 mg/mL; este procedimiento se desarrolló de acuerdo con el método descrito en el acápite 2.4.3.2.

En la Figura 3.10 se presenta la actividad proteolítica de papaína sin el extracto inhibidor y con el extracto inhibidor de fréjol de concentraciones finales en la mezcla de reacción iguales a 0,035; 0,104 y 0,243 mM; los valores obtenidos y el análisis estadístico correspondiente se detallan en la Tabla AVI.1, del Anexo VI.

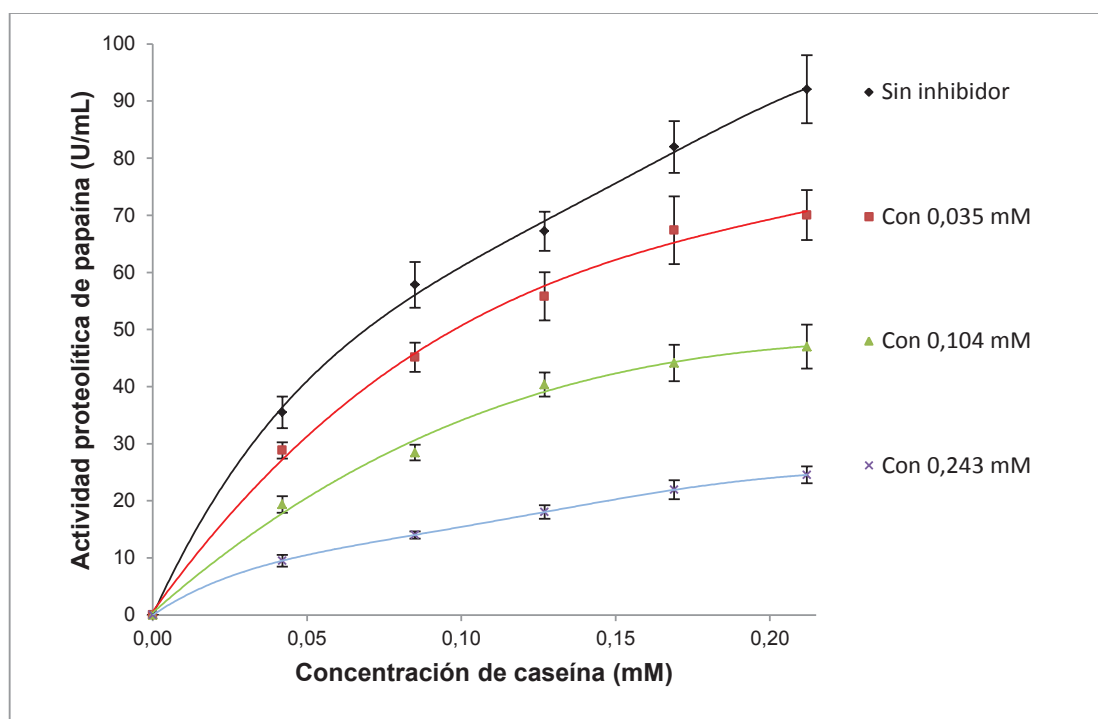


Figura 3.10 Actividad proteolítica de papaína en presencia y ausencia del extracto semipurificado de fréjol, a diferentes concentraciones de sustrato

La actividad proteolítica de papaína se incrementó con la concentración de caseína en ausencia y presencia del extracto inhibidor, el comportamiento que se observa es característico del modelo cinético de Michaelis-Menten. También se

puede apreciar que las tres concentraciones de extracto inhibidor disminuyeron la actividad proteolítica de papaína en todas las concentraciones de sustrato.

En la Figura 3.11 se presenta el gráfico de los dobles recíprocos sin inhibidor y a 0,035; 0,104 y 0,243 mM del inhibidor, así como el tipo de tendencia, con sus respectivas ecuaciones.

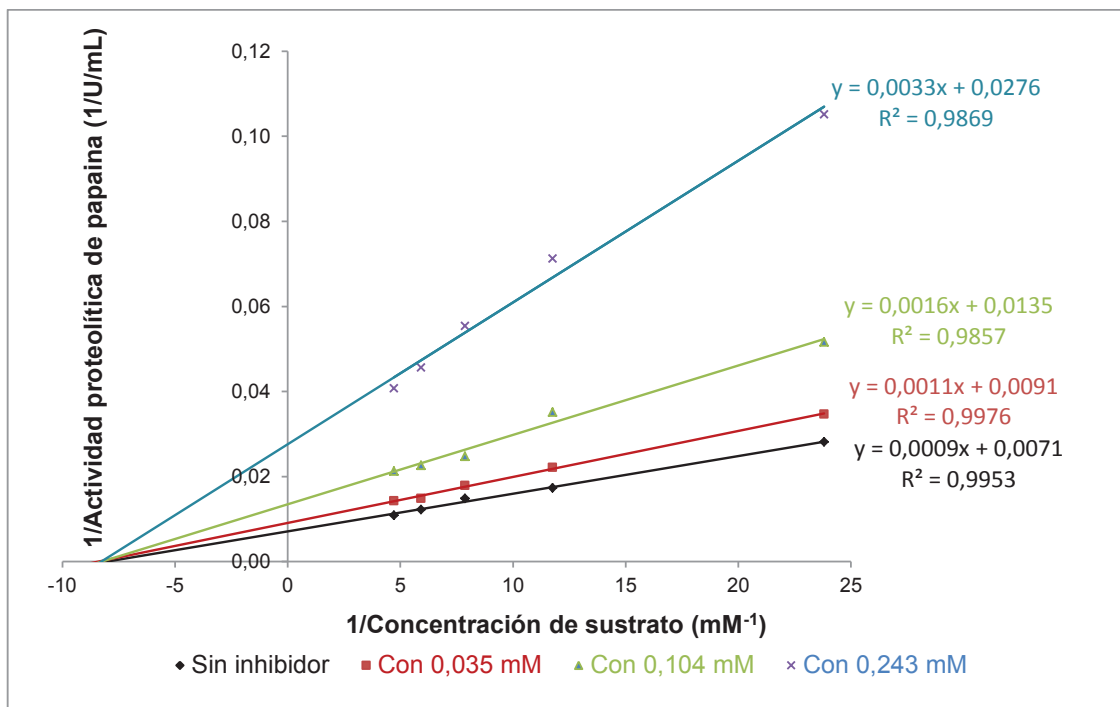


Figura 3.11 Linealización de las ecuaciones de Michaelis-Menten determinadas para la actividad proteolítica de papaína en presencia y ausencia del extracto semipurificado de fréjol, a diferentes concentraciones de sustrato

Existe una tendencia lineal, entre los valores inversos de la concentración de caseína y de la actividad proteolítica de papaína, en presencia y ausencia del extracto inhibidor, con valores de R² mayores a 0,98.

Las rectas convergen en un mismo valor y sus pendientes aumentan con la concentración de inhibidor, este comportamiento es característico de la inhibición no competitiva; sin embargo, es necesario comparar los parámetros cinéticos Km y V_{máx} que se presentan en la Tabla 3.13. Los ejemplos de cálculo se detallan en el Anexo VI.

Tabla 3.13 Parámetros cinéticos de la AE de papaína en presencia y ausencia del extracto inhibidor semipurificado de fréjol, a diferentes concentraciones de sustrato

	[] (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ (U/mL)	K_m (mM)	α'	IC_{50} (mM)
Sin inhibidor	0,000	142,86	0,129		
Con inhibidor	0,035	111,11	0,122	1,29	0,123
	0,104	75,19	0,120	1,90	0,116
	0,243	36,63	0,121	3,90	0,084

Como se puede apreciar, el valor de K_m no presenta diferencias significativas en los cuatro ensayos, mientras que la $V_{m\acute{a}x}$ disminuye con el aumento en la concentración de inhibidor; este comportamiento es característico de un inhibidor no competitivo.

La sustancia inhibidora puede unirse a la enzima independientemente de que el sustrato se haya unido o no a la enzima. El inhibidor se une a la enzima en un sitio diferente al centro activo; es decir, no impide la formación del complejo enzima-sustrato; sin embargo, este complejo es inactivo con la presencia del inhibidor (Nelson y Cox, 2009, p. 208).

De acuerdo con el análisis comparativo, para calcular el valor de IC_{50} es necesario primero calcular el factor α' , que relaciona la $V_{m\acute{a}x}$ sin inhibidor con la $V_{m\acute{a}x}$ con inhibidor, estos parámetros también se muestran en la Tabla 3.13 y el ejemplo de cálculo se detalla en el Anexo VI.

Para el extracto semipurificado de fréjol se determinó un valor de IC_{50} de $0,107 \pm 0,021$ mM, frente a papaína, con caseína como sustrato.

3.5.2.2. Cálculo del IC_{50} del extracto semipurificado de chocho frente a quimotripsina

Se determinó en valor de IC_{50} para el extracto semipurificado de chocho, que se obtuvo luego del proceso de concentración por evaporación. Para el cálculo de

K_m y $V_{m\acute{a}x}$ se determinó la actividad proteolítica de quimotripsina en ausencia de inhibidor y con soluciones del extracto inhibidor de concentraciones 1, 2 y 3 mg/mL; este procedimiento se desarrolló de acuerdo con el método descrito en el acápite 2.4.3.2.

En la Figura 3.12 se presenta la actividad proteolítica de quimotripsina sin el extracto inhibidor y con el extracto inhibidor semipurificado de chocho a tres concentraciones finales en la mezcla de reacción iguales a 0,015; 0,031 y 0,046 mM. Los valores obtenidos y el análisis estadístico correspondiente se detallan en la Tabla AVI.2 del Anexo VI.

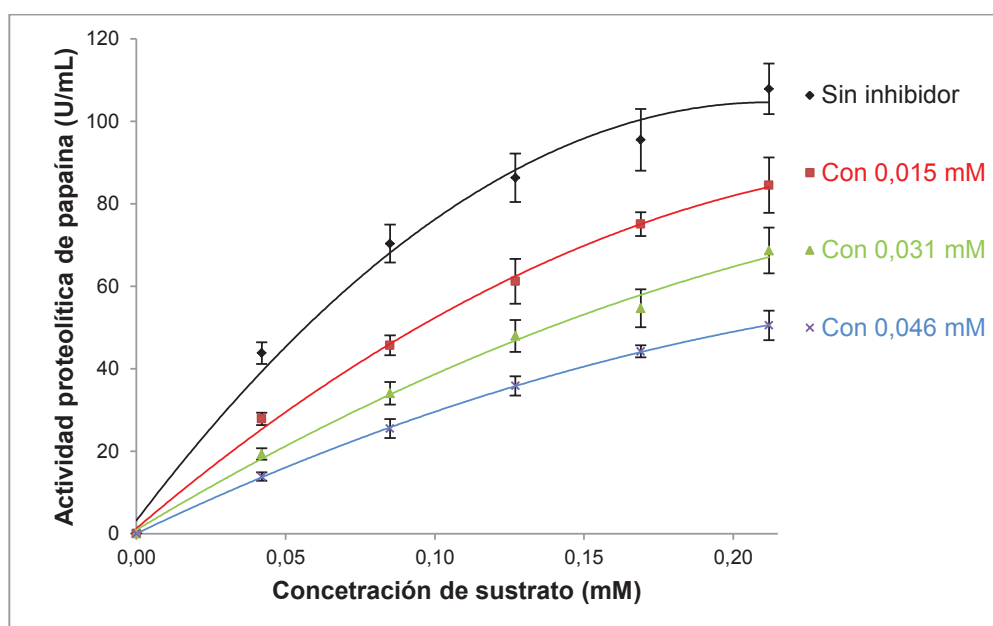


Figura 3.12. Actividad proteolítica de quimotripsina en presencia y ausencia del extracto semipurificado de chocho, a diferentes concentraciones de sustrato

Como se puede observar, existe un comportamiento cinético Michaeliano en ausencia y presencia del extracto inhibidor. En todas las concentraciones de sustrato, existen diferencias significativas ($p < 0,05$) en actividad, para los cuatro ensayos.

Para calcular los parámetros cinéticos K_m y $V_{m\acute{a}x}$, se linealizó la ecuación con el método de los dobles recíprocos establecido por Lineweaver-Burk y la gráficas resultantes se presentan en la Figura 3.13.

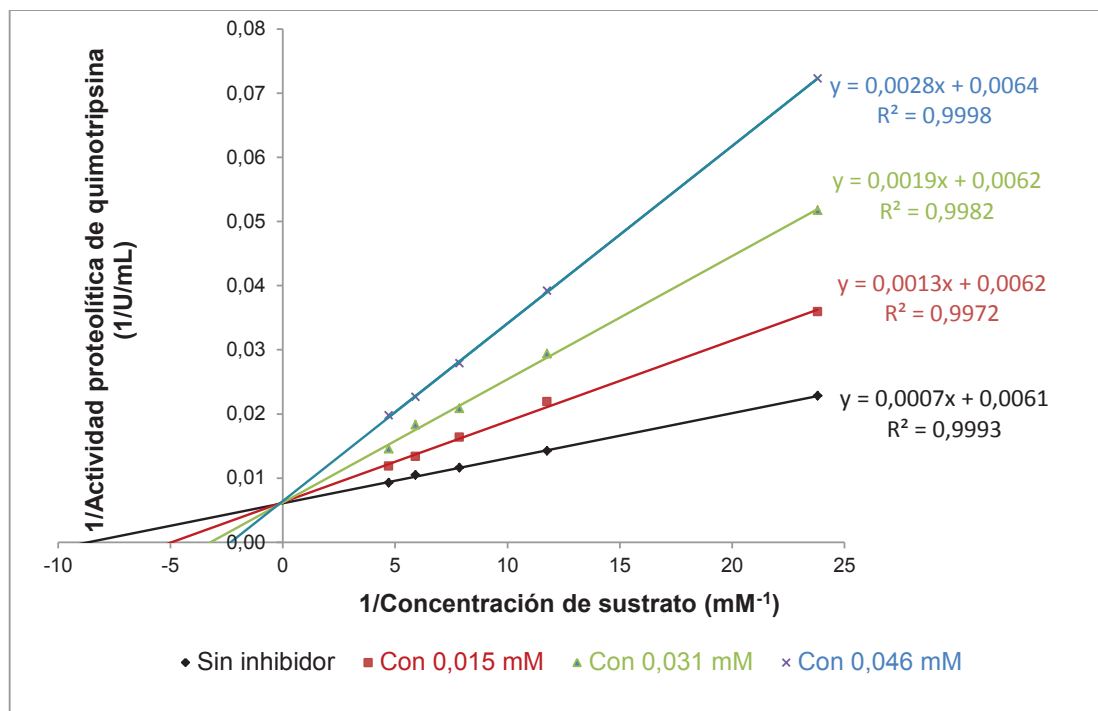


Figura 3.13. Linealización de las ecuaciones de Michaelis-Menten determinadas para la actividad proteolítica de quimotripsina en presencia y ausencia del extracto semipurificado de chocho, a diferentes concentraciones de sustrato

Se observa una relación lineal entre los inversos de sustrato y la actividad proteolítica de quimotripsina, en presencia y ausencia de extracto inhibidor de chocho, con valores de R^2 mayores a 0,99. Aunque el comportamiento de las curvas en las Figuras 3.11 y 3.13 es lineal, difieren en el punto de confluencia, de este modo se concluye que el tipo de inhibición para los dos extractos es distinto.

En la Figura 3.13, las rectas convergen en el mismo punto sobre el eje de las abscisas y su pendiente aumenta con la concentración de inhibidor, este comportamiento es característico de la inhibición competitiva.

El tipo de inhibición se determina de manera más precisa al comparar los parámetros cinéticos K_m y $V_{m\acute{a}x}$; estos parámetros se presentan en la Tabla 3.14.

Los datos con los que se construyó la gráfica de la linealización de Lineweaver-Burk y los ejemplos de cálculo se detallan en el Anexo VI.

Tabla 3.14. Parámetros cinéticos de la actividad proteolítica de quimotripsina en presencia y ausencia del extracto inhibidor semipurificado de chocho, a diferentes concentraciones de sustrato

	[] mM	$V_{m\acute{a}x}$ (U/mL)	K_m (mM)	α	IC_{50} (mM)
Sin inhibidor	0,000	163,93	0,11		
Con inhibidor (mM)	0,015	161,29	0,21	1,83	0,018
	0,031	161,29	0,31	2,67	0,019
	0,046	156,25	0,44	3,81	0,016

Los valores de $V_{m\acute{a}x}$ no presentaron diferencias entre sí, en los cuatro ensayos, mientras que, los valores de K_m aumentaron con la concentración de inhibidor. Con esta comparación se puede confirmar que se trata de un inhibidor competitivo.

En la inhibición competitiva, la sustancia inhibidora compite con el sustrato. El inhibidor se une a la enzima en el centro activo; es decir, impide la formación del complejo enzima-sustrato (Nelson y Cox, 2009, p. 210).

De acuerdo con el análisis comparativo, para calcular el valor de IC_{50} es necesario, primero, calcular el factor α , que relaciona la K_m sin inhibidor con la K_m con inhibidor. Estos parámetros también se muestran en la Tabla 3.14 y el ejemplo de cálculo se detalla en el Anexo VI.

Para el extracto semipurificado de chocho se determinó un valor de IC_{50} de $0,018 \pm 0,0012$ mM frente a quimotripsina, con caseína como sustrato.

3.6. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LAS SOLUCIONES CONCENTRADAS DEL INHIBIDOR MÁS ACTIVO FRENTE A LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO

3.6.1. EVALUACIÓN DEL ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL EXTRACTO INHIBIDOR SEMIPURIFICADO DE FRÉJOL

En la Tabla 3.15 se muestran los resultados de la actividad inhibidora, frente a papaína, del extracto semipurificado de fréjol, almacenado a tres temperaturas: ambiente (17 °C), refrigeración (4 °C), y congelamiento (-20 °C), durante cuatro semanas. El análisis estadístico se realizó como se indica en la sección 2.5.

Tabla 3.15. Actividad inhibidora del extracto semipurificado de fréjol, frente a papaína almacenado a tres temperaturas durante cuatro semanas

Tiempo (semanas)	Actividad inhibidora (U/mL)		
	17 °C	4 °C	-20 °C
0	95,40 ± 0,89 ^A	97,13 ± 1,63 ^A	95,77 ± 1,45 ^A
1	73,23 ± 1,07 ^B	91,93 ± 1,89 ^B	96,37 ± 1,00 ^A
2	59,47 ± 0,81 ^C	83,77 ± 1,16 ^C	95,17 ± 1,03 ^A
3	50,40 ± 2,23 ^D	78,17 ± 0,06 ^D	95,87 ± 2,01 ^A
4	38,73 ± 1,44 ^E	71,30 ± 0,92 ^E	95,57 ± 1,42 ^A

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

Letras distintas en la misma columna señalan diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$)

La actividad inhibidora frente a papaína del extracto semipurificado de fréjol, almacenado durante cuatro semanas, disminuyó un 53 % a temperatura ambiente (17 °C), un 27 % a temperatura de refrigeración (4°C) y a temperatura de congelamiento (-20 °C) no presentaron diferencias significativas de actividad inhibidora, según el análisis estadístico aplicado.

En la Figura 3.14 se muestra la gráfica de la actividad inhibidora de fréjol en papaína versus el tiempo de almacenamiento, para las tres temperaturas de experimentación.

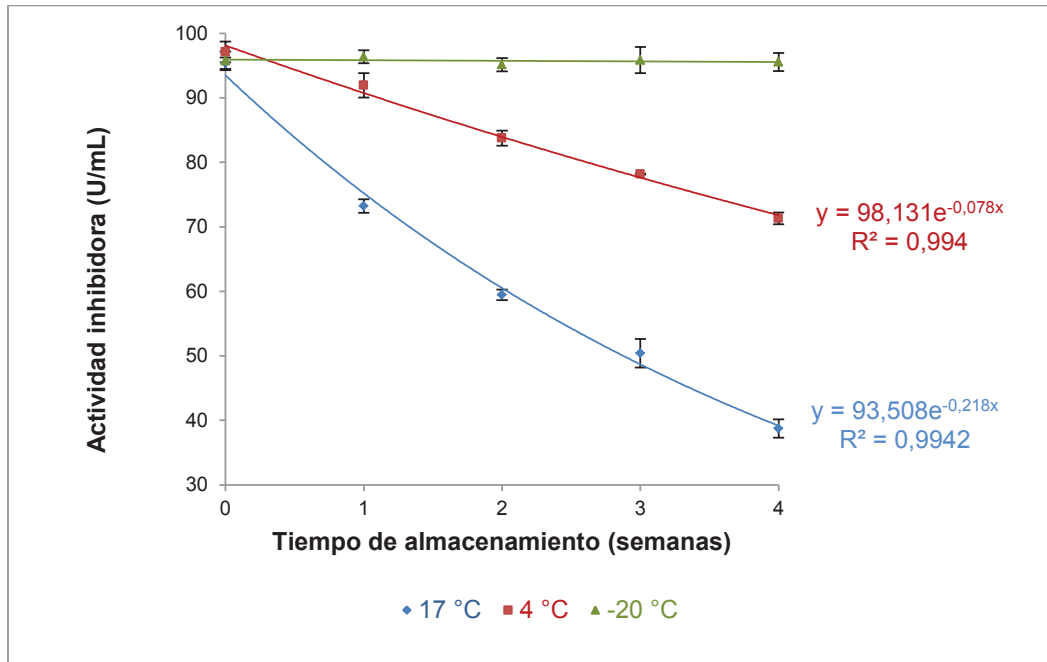


Figura 3.14 Actividad inhibidora del extracto semipurificado de fréjol almacenado a tres temperaturas durante cuatro semanas

Como se puede observar, la actividad inhibidora de los extractos almacenados a temperatura ambiente y refrigeración disminuye con una tendencia de tipo exponencial, mientras que a temperatura de congelamiento no se aprecia ninguna variación, como lo confirma el análisis estadístico.

Las ecuaciones de las líneas de tendencia para las temperaturas ambiente y congelación se ajustaron a la Ecuación 2.8, que se presenta en la sección 2.1.2; de esta manera se puede determinar la constante de inactivación, que para la temperatura ambiente fue de $0,189 \text{ semanas}^{-1}$ y para la temperatura de refrigeración fue de $0,078 \text{ semanas}^{-1}$. Las muestras almacenadas a temperatura ambiente pierden su actividad inhibidora 2,4 veces más rápido en comparación a las almacenadas a temperatura de refrigeración. Mientras que las muestras almacenadas a temperatura de congelamiento no perdieron actividad inhibidora.

De acuerdo con estos resultados, se puede concluir que la temperatura de almacenamiento para el extracto semipurificado de fréjol es determinante para la estabilidad. El mejor proceso de conservación se encontró a temperatura de

congelación (-20 °C), además de que a esta temperatura se detiene un eventual ataque microbiológico.

3.6.2. EVALUACIÓN DEL ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL EXTRACTO INHIBIDOR SEMIPURIFICADO DE CHOCHO

En la Tabla 3.16 se presentan los resultados de la actividad inhibidora del extracto semipurificado de chocho, frente a quimotripsina almacenado a tres temperaturas: ambiente (17 °C), refrigeración (4 °C), y congelamiento (-20 °C), durante cuatro semanas. El análisis estadístico se realizó como se indica en la sección 2.5.

Tabla 3.16. Actividad inhibidora del extracto semipurificado de chocho, frente a quimotripsina almacenado a tres temperaturas durante cuatro semanas

Tiempo (semanas)	Actividad inhibidora (U/mL)		
	17 °C	4 °C	-20 °C
0	122,63 ± 2,15 ^A	125,77 ± 2,17 ^A	125,13 ± 1,37 ^A
1	103,13 ± 2,15 ^B	111,57 ± 1,70 ^B	123,27 ± 2,35 ^A
2	80,27 ± 0,61 ^C	95,87 ± 2,23 ^C	118,07 ± 1,31 ^B
3	58,13 ± 2,30 ^D	84,60 ± 1,55 ^D	113,43 ± 1,70 ^C
4	51,37 ± 1,39 ^E	71,10 ± 3,34 ^E	106,60 ± 1,49 ^D

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

Letras distintas en la misma columna señalan diferencias estadísticas significativas (p < 0,05)

Existe disminución de la actividad inhibidora frente a quimotripsina del extracto de chocho con diferencias estadísticas significativas en las tres temperaturas, durante las cuatro semanas de almacenamiento. Se presenta una pérdida de actividad inhibidora del 58 % a temperatura ambiente, del 43 % a temperatura de refrigeración y del 15 % para la temperatura de congelamiento.

Los resultados para las tres temperaturas presentan una tendencia de tipo exponencial, con valores de R² mayores a 0,96, como se observa en la Figura 3.15; además se puede apreciar la ecuación que rige esta tendencia y las constantes de inactivación.

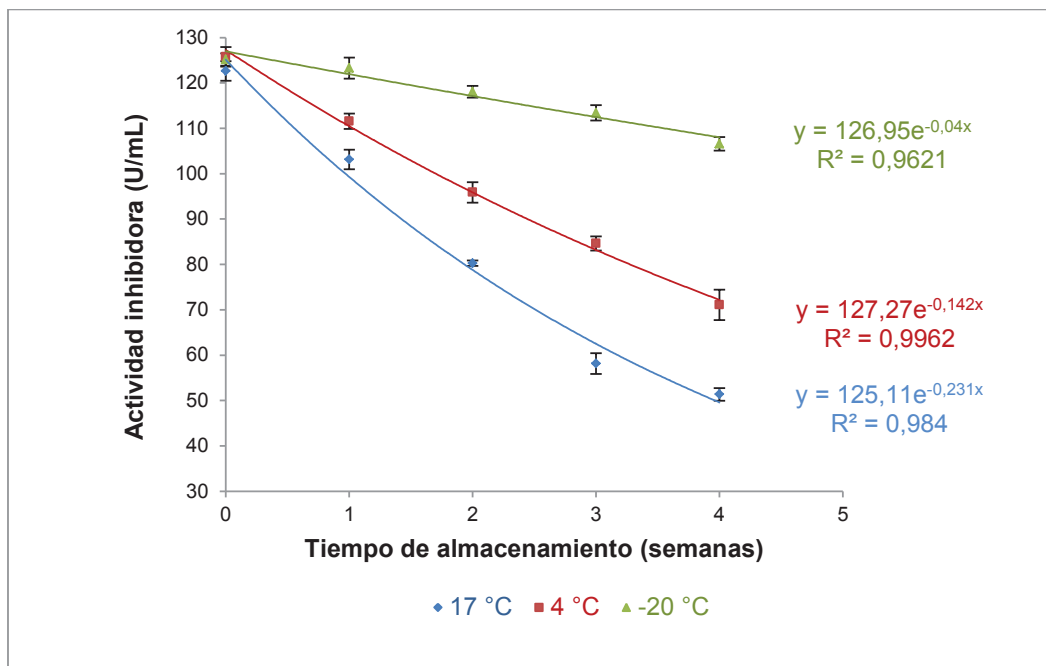


Figura 3.15. Actividad inhibidora del extracto semipurificado de chocho almacenado a tres temperaturas durante cuatro semanas

La temperatura de almacenamiento es determinante para la estabilidad del extracto inhibitor semipurificado de chocho. Como se puede observar en la Figura 3.15, mientras más alta es la temperatura de almacenamiento, la pérdida de la actividad inhibidora es mayor.

De las ecuaciones que ajustan las líneas de tendencia, se determinaron las constantes de inactivación para las tres temperaturas de almacenamiento, con los siguientes valores: $0,231\text{ semanas}^{-1}$, a temperatura ambiente; $0,142\text{ semanas}^{-1}$, a temperatura de refrigeración; y, $0,04\text{ semanas}^{-1}$, a temperatura de congelamiento.

Las muestras almacenadas a temperatura ambiente pierden su actividad inhibidora, respectivamente, 1,6 y 5,7 veces más rápido en comparación con las almacenadas a temperatura de refrigeración y congelamiento. Mientras que, las muestras almacenadas a temperatura de refrigeración pierden actividad 3,5 veces más rápido que las almacenadas a temperatura de congelamiento.

Según estos resultados y los encontrados en la sección anterior, luego de que las muestras se almacenaron por cuatro semanas, se estableció que la actividad inhibidora presentó una menor disminución a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; puesto que a esta temperatura, en el primer caso, no se encontraron diferencias significativas de actividad inhibidora y, en el segundo caso, la disminución fue apenas del 15 %.

Inhibidores comerciales de proteasas, como Ritonavir y Lopinavir, son estables en solución a temperatura de refrigeración durante un mes y, en cápsulas a temperatura ambiente mantienen su actividad durante dos meses (Soto, Gutiérrez y Seas, 2005, p. 4). Por lo tanto, la estabilidad de los inhibidores encontrados en este estudio es buena y comparable a la de inhibidores comerciales.

3.7. DISEÑO DE UNA PLANTA PILOTO PARA LA OBTENCIÓN DE INHIBIDORES PURIFICADOS DE CARBOXIPEPTIDASA A, PAPAÍNA O QUIMOTRIPSINA

En la actualidad, se han descubierto aplicaciones importantes para los inhibidores de proteasas, especialmente en el campo biotecnológico, en la biomedicina, en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades como el cáncer, el Alzheimer; desórdenes inmunológicos, infecciones respiratorias; infecciones parasitarias, fúngicas y virales, como la malaria y el VIH (García et al., 2009, p. 3).

La malaria o paludismo es una enfermedad transmitida, principalmente, por mosquitos y provocada por parásitos del género *Plasmodium*, los mismos que en su proceso de reproducción utilizan diversas proteasas, que pueden ser inhibidas, para impedir la proliferación parasitaria (Benítez, 2005, p. 110).

En el presente estudio, se desarrolló una estrategia para obtener inhibidores de quimotripsina y papaína provenientes de extractos de las semillas de chocho y fréjol, que en investigaciones futuras podrían ensayarse frente a proteasas diana del *Plasmodium*.

En esta sección se diseñó una planta a escala piloto, para la obtención de inhibidores semipurificados, en la cual se estableció la capacidad de procesamiento, se calcularon los balances de masa y energía y se seleccionaron los equipos y accesorios. Se realizaron los diagramas BFD, PFD, así como la distribución de las áreas de producción, administrativas, exteriores y sanitarias.

3.7.1. CAPACIDAD DE LA PLANTA

Para definir la capacidad de la planta, se investigó el número de personas infectadas con malaria durante los dos últimos años, en Ecuador. Según el Ministerio de Salud Pública fue de 613 casos; y las dosis promedio de inhibidores comerciales como Lopinavir, suministradas a pacientes adultos con malaria, fue de 800 mg durante 7 a 14 días de tratamiento (Chassaigne, 2001, p. 86).

De acuerdo con esta información se estableció que la dosis total por paciente adulto, durante todo el tratamiento, fue de 11,20 g de fármaco. Si se asume que la cifra de infectados con malaria en Ecuador se mantiene en un valor promedio de 600 casos durante los próximos años, serían necesarios 6 720 g de fármaco por año, para tratar esta enfermedad.

Por otra parte, en la Tabla 3.12 se muestra la concentración proteica de los extractos de fréjol y chocho. Con la concentración del inhibidor de fréjol (7,49 mg/mL), por ser la menor, y con la dosis anual de fármaco necesaria para Ecuador, se estableció un volumen de producción de 897 L/año.

Este volumen de producción es aproximado, ya que no se consideran algunos aspectos, como la efectividad de estos inhibidores en el tratamiento de la malaria, la dosis necesaria según el tipo de *Plasmodium* que provocó la enfermedad, así como también la posibilidad de usar estos extractos como fármacos para otras enfermedades como hepatitis o infecciones.

Sin embargo, al tratarse de una planta a escala piloto, que por definición es muy versátil en los volúmenes de producción y en las operaciones unitarias requeridas en el proceso, se propone el diseño de la planta con una capacidad de 5 L diarios de extracto inhibidor.

El trabajo se desarrollará en un proceso batch, de un solo turno de 8 h diarias, los 5 días laborables de la semana, durante todo el año. Con esta producción se cubre la demanda por año antes indicada.

3.7.2. MATERIA PRIMA E INSUMOS

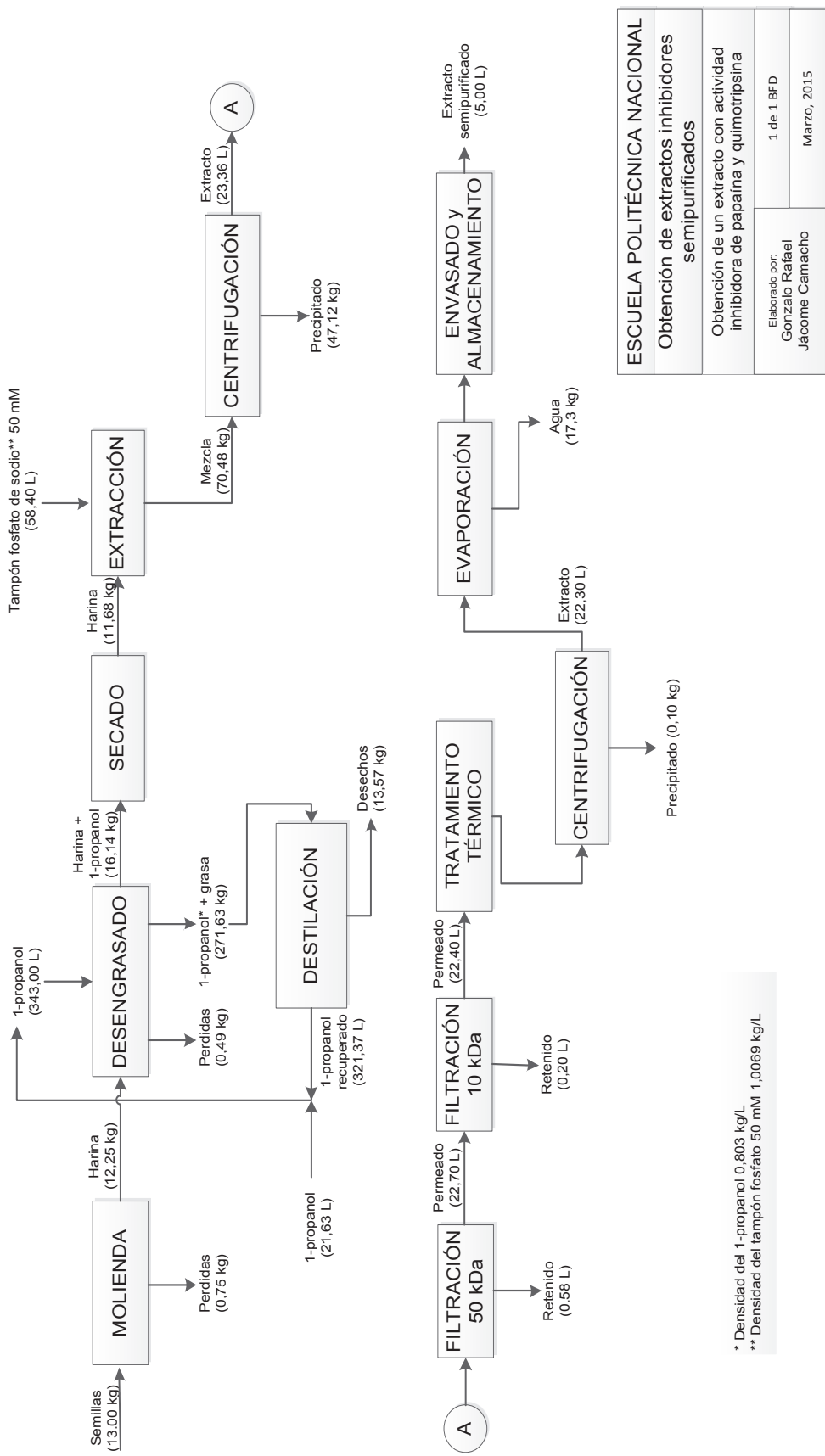
La materia prima e insumos requeridos para la obtención de extractos inhibidores de papaína y quimotripsina son los siguientes: semillas de fréjol (*Phaseolus vulgaris L.*) y chocho (*Lupinus mutabilis*), solvente (1-propanol), fosfato de sodio, hidróxido de sodio, agua destilada, envases, etiquetas y cajas de cartón para el proceso de empaclado.

3.7.3. DISEÑO DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN

El proceso de producción es presentado en el diagrama de bloques (BFD) de la figura 3.16.

3.7.4. PLANO DE SIMBOLOGÍA, ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA UTILIZADA EN EQUIPOS Y LÍNEAS DE CORRIENTES

Los equipos fueron codificados de acuerdo con el orden de seguimiento del proceso, con dos letras mayúsculas y un número de tres dígitos para cada equipo, como se observa en la Tabla 3.17.



* Densidad del 1-propanol 0.803 kg/L
 ** Densidad del tampón fosfato 50 mM 1.0069 kg/L

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL	
Obtención de extractos inhibidores semipurificados	
Obtención de un extracto con actividad inhibidora de papaína y quimotripsina	
Elaborado por: Gonzalo Rafael Jácome Camacho	1 de 1 BFD Marzo, 2015

Figura 3.16. Diagrama de bloques del proceso de producción (BFD)

Tabla 3.17. Codificación de los equipos de la planta piloto

PROCESO	EQUIPO	CODIFICACIÓN
Molienda	Molino de disco	MO-101
	Tanque abierto	TT-102
Desengrasado	Elevador de cangilones	EC-103
	Tanque con agitación	TA-104
	Tanque de almacenamiento	TC-105
Destilación	Recuperador de solventes	RS-106
Secado	Secador de bandejas	SB-107
	Tanque abierto	TT-108
Extracción	Elevador de cangilones	EC-109
	Tanque con agitación	TA-110
	Tanque de almacenamiento	TC-111
Centrifugación	Centrífuga	CC-112
Filtración 50 kDa	Filtrador tangencial	FT-113
Filtración 10 kDa	Filtrador tangencial	FT-114
Tratamiento térmico	Marmita con agitación	MM-115
Centrifugación	Centrífuga	CC-116
Evaporación	Concentrador por evaporación	CE-117
Envasado y almacenamiento	Envasadora	EV-118
	Cámara de congelación	CF-119

El diagrama de flujo del proceso PFD, que se muestra en la Figura 3.17, detalla los equipos con su respectivo código y las corrientes numeradas de acuerdo con el orden de aparición. En la Tabla 3.18 se muestra la simbología de los equipos que se usaron en el PFD.

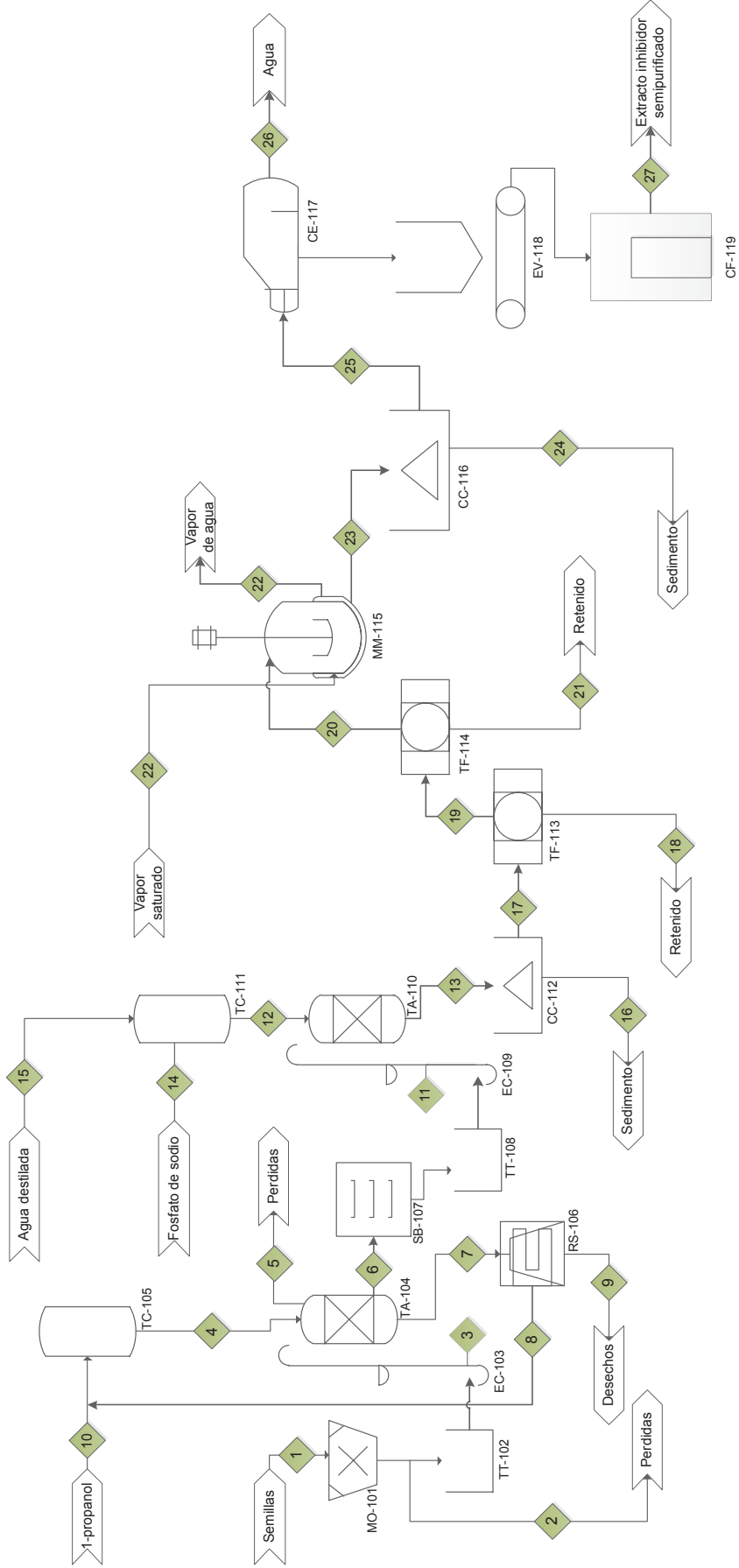


Figura 3.17. Diagrama de flujo del proceso de producción (PFD)

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL	
Obtención de extractos inhibidores semipurificados	
Obtención de un extracto con actividad inhibidora de papaína y quimotripsina	
Elaborado por: Gonzalo Rafael Jácome Camacho	1 de 1 PFD
	Marzo, 2015

Tabla 3.18. Simbología de los equipos utilizados en el PFD

 <p>Molino</p>	 <p>Tanque abierto</p>	 <p>Elevador de cangilones</p>	 <p>Tanque con agitación</p>
 <p>Tanque de almacenamiento</p>	 <p>Recuperador de solventes</p>	 <p>Secador de bandejas</p>	 <p>Centrífuga</p>
 <p>Filtrador tangencial</p>	 <p>Marmita</p>	 <p>Evaporador</p>	 <p>Envasadora</p>
 <p>Cámara de congelación</p>			

3.7.5. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO TECNOLÓGICO

Las semillas serán adquiridas en la estación Santa Catalina del INIAP, en donde se cultivan, seleccionan y benefician. El proceso comienza con la molienda de las semillas, en un molino de disco (MO-101), apto para granos con contenidos medios de grasa, hasta alcanzar partículas de tamaño menor a 0,01 mm; la harina se deposita en un tanque abierto (TT-102), desde donde se alimenta a un tanque con agitación (TA-104), mediante un elevador de cangilones (EC-103), para el proceso de desengrasado, este tanque también es alimentado con 1-propanol desde otro tanque de almacenamiento (TA-105), a través de la corriente 4 en una proporción 1:4 harina-solvente, luego de 30 min, mediante bombeo, se retira el solvente y se vuelve a cargar solvente limpio en la misma proporción. Este procedimiento se repite hasta que la corriente 7 no presente turbidez, que para el caso de las semillas de fréjol corresponde a 7 repeticiones.

El 1-propanol, contaminado con grasa y residuos de harina, entra a un equipo denominado recuperador de solventes (RS-106) que, mediante destilación, separa los desechos (9) del 1-propanol recuperado (8), el cual se recircula e ingresa nuevamente al tanque de almacenamiento TC-105 junto con la corriente 10 que compensa las pérdidas en el proceso.

La harina desengrasada se coloca en un secador de bandejas (SB-107) para retirar el resto de solvente, luego la harina desengrasada se deposita en un tanque abierto (TT-108) para que, mediante un elevador de cangilones (EC-109), se coloque en el tanque con agitación TA-110.

El tampón fosfato de sodio 50 mM, que sirve para la homogenización, se prepara en el taque TC-111, luego se mezcla con harina en una proporción harina:tampón 1:5, durante 1,5 h.

La mezcla se separa en dos centrifugas (CC-112) a $2\ 800 \times g$, con recipientes de 2 L de capacidad, durante 30 min. El precipitado se retira como desecho y el sobrenadante se alimenta a un equipo de filtración tangencial (TF-113), provisto

con una membrana con tamaño de poro de 50 kDa. Se desecha el retenido y el permeado se filtra nuevamente en otro sistema de filtración tangencial (TF-114), con una membrana de 10 kDa; el nuevo permeado (20) se carga en una marmita (MM-115) que se calienta con vapor saturado, hasta una temperatura de 60 °C, con leve agitación durante 30 min, para precipitar proteínas que no son de interés.

Mediante centrifugación (CC-116) a $2\ 800 \times g$, durante 30 min, se desecha el precipitado y el sobrenadante se concentra (CE-117), mediante evaporación a presión parcial de vacío, en un equipo que consta de una marmita cerrada conectada a un condensador, a una temperatura de 55 °C.

El extracto inhibidor se envasa en un equipo semiautomático (EV-118) en botellas de plástico esterilizadas, luego se almacenan en una cámara de congelación (CF-119) a -20 °C, para su posterior uso o mayor concentración.

3.7.6. BALANCE DE MASA

El balance de masa se resume a continuación en las Tablas 3.19, 3.20 y 3.21, de acuerdo con las corrientes que se indican en el PFD.

Tabla 3.19. Resumen del balance de masa en las corrientes 1 a la 9

Componente	Corrientes								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Semillas (kg/d)	13,00								
Harina (kg/d)			12,25			11,76			
1-propanol* (L/d)				343,00		5,45	337,55	321,37	
Grasa (kg/d)							0,58		
Desechos (kg/d)									13,57
Pérdidas (kg/d)		0,75			0,49				
TOTAL (kg/d)	13,00	0,75	12,25	275,43	0,49	16,14	271,63	258,06	13,57

* La densidad del 1-propanol es 0,803 kg/L

Tabla 3.20. Resumen del balance de masa en las corrientes 10 a la 18

Componente	Corrientes								
	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Harina (kg/d)		11,68							
1-propanol* (L/d)	21,63								
Agua _D (L/d)			58,40			58,40			
NaH ₂ PO ₄ (kg/d)			0,40		0,40				
Extracto (L/d)				70,48				23,36	
Precipitado (kg/d)							47,12		
Retenido (L/d)									0,58
TOTAL (kg/d)	17,36	11,68	58,80	70,48	0,40	58,40	47,12	23,36	0,58

* La densidad del 1-propanol es 0,803 kg/L

Tabla 3.21. Resumen del balance de masa en las corrientes 19 a la 27

Componente	Corrientes								
	19	20	21	22	23	24	25	26	27
Agua _D (L/d)								17,30	
Extracto (L/d)	22,70	22,40			22,30		22,30		5,00
Precipitado (kg/d)					0,10	0,10			
Retenido (L/d)			0,20						
Vapor de agua (kg/d)				4,88					
TOTAL (kg/d)	22,70	22,40	0,20	4,88	22,40	0,10	22,30	17,30	5,00

3.7.7. BALANCE DE ENERGÍA

Se determinó la cantidad de energía requerida en los procesos que involucran cambio de temperatura; es decir, en los procesos de precipitación por tratamiento térmico y concentración por evaporación. Los cálculos se detallan en el Anexo VII y se resumen a continuación, en la Tabla 3.22.

Tabla 3.22. Cantidad de energía requerida en los procesos con cambio de temperatura

Proceso	Cantidad de energía (kJ/d)
Tratamiento térmico	4 033,74
Concentración por evaporación	3 540,99
TOTAL	7 574,73

3.7.8. REQUERIMIENTO DE VAPOR

El requerimiento de vapor se determinó de acuerdo con la cantidad de energía necesaria de la planta, que se indica en la Tabla 3.22, más un factor de seguridad del 40 %, que garantiza el suministro suficiente de vapor, incluso cuando se requiera aumentar la producción. Entonces, la cantidad de energía con que se calculó la masa de vapor fue 10 604,62 kJ/d.

La cantidad de vapor requerida es 4,88 kg/d, este valor se calculó mediante la Ecuación 2.9 que se indica en la sección 2.6

3.7.9. DIMENSIONAMIENTO DEL CALDERO

Para generar la cantidad de vapor que se requiere en la planta piloto es necesario un caldero cuya capacidad se calculó en BHP, de acuerdo con la Ecuación 2.10. Se estimó que el caldero funcionará durante 45 min al día, y con la cantidad de energía requerida (10 604,62 kJ/d), la capacidad mínima calculada es 0,40 BHP.

3.7.10. DISEÑO BÁSICO DE LA PLANTA PILOTO

Se diseñó la planta piloto, con una disposición en forma de “U”, con un espaciamiento mínimo entre equipos de 0,60 m, para facilitar la limpieza y el flujo de operarios. El ordenamiento de los equipos puede variar según las necesidades futuras de la planta, en cuanto a nuevas estrategias para la obtención de los

inhibidores y su mayor purificación. En el Anexo VIII se presentan las hojas con las especificaciones técnicas de los equipos.

La planta contará con dos bodegas, la primera para el almacenamiento de materias primas y la segunda para suministros, como envases y etiquetas.

En el Anexo IX se presenta la distribución del área de producción “LAY OUT” en donde se detalla la ubicación y el espaciamiento de los equipos.

La planta contará con un ingreso peatonal hasta el área sanitaria, que estará dividida para hombres y mujeres, en donde el personal de producción se proveerá de la vestimenta adecuada para el ingreso a la planta.

El área de producción, bodegas y área sanitaria se encuentran elevadas 0,80 m con respecto al nivel del piso, para facilitar el movimiento de producto desde y hacia los vehículos y para evitar el ingreso de plagas. En el Anexo X se presentan los cortes de elevación.

Junto al área de producción, se construirá un laboratorio de calidad e investigación. Por la naturaleza del producto a procesar es necesario elaborar un plan permanente de investigación y desarrollo de nuevas estrategias de purificación de los inhibidores y la experimentación con nuevas materias primas.

Además, la planta dispondrá de un área administrativa, con todas las facilidades para establecer una estructura organizacional que planificará las actividades y el desempeño general de la planta. En el Anexo XI se presenta la distribución de todas las áreas con las que cuenta la planta piloto, en apreciación 2D y 3D.

3.8. EVALUACIÓN DE LOS COSTOS DEL PROYECTO

Para estimar el costo de producción de 5 L/d de extracto semipurificado con actividad inhibidora de papaína y quimotripsina, se consideraron el costo de la

materia prima, reactivos e insumos, así como el costo de la maquinaria de la planta piloto y el capital de trabajo inicial.

3.8.1. INVERSIÓN TOTAL DE LA PLANTA PILOTO

Los montos para la adquisición de los activos fijos, activos diferidos y el capital inicial se detallan en el Anexo XII, y se resumen a continuación, en la Tabla 3.23

Tabla 3.23. Activos fijos, activos diferidos y capital inicial de la planta piloto

Parámetros		Costo (\$)	(%)
Activos fijos	Terreno	38 867,20	10,49
	Construcción de la planta	126 468,00	34,13
	Equipos	58 550,00	15,80
	Instalación de equipos	25 000,00	6,75
	Laboratorio	50 000,00	13,49
	Equipamiento de oficinas	10 000,00	2,70
Activos diferidos		31 750,39	8,57
Capital de operación		4 107,08	1,11
Imprevistos (7 %)		25 815,84	6,97
TOTAL		370 558,51	100 %

La construcción de la planta será el rubro más alto, con el 34,13 % de la inversión total. El equipamiento de la planta y del laboratorio serán los siguientes rubros más altos, con el 15,80 y 13,49 %, respectivamente.

La planta piloto se localizará en el sector industrial de la parroquia Amaguaña del cantón Quito, por su cercanía a los proveedores de materia prima, insumos y suministros; además, el lugar cuenta con vía asfaltadas de primer orden, mano de

obra local, suministro permanente de agua y energía, entre otras características que garantizaran el adecuado funcionamiento de la planta.

3.8.2. AMORTIZACIÓN DE LA PLANTA PILOTO

La amortización de la planta se calculó para 10 años, este tiempo es sugerido por varias fuentes bibliográficas, especialmente para equipos, no obstante en otros activos, como el valor de terreno, se han determinado valores de salva hasta del 90 %.

En la Tabla 3.24 se presenta un resumen de la amortización de los activos fijos, activos diferidos y capital inicial; estos rubros se detallan en el Anexo XII.

Tabla 3.24. Amortización de la planta piloto a 10 años

Parámetro	Amortización por lote
Activo fijo	106,89
Activo diferido	15,88
Capital inicial	2,05
TOTAL	124,82

3.8.3. CONSUMO DE ENERGÍA DE LA PLANTA PILOTO

Se calculó el consumo de energía de los equipos de la planta, de acuerdo con las especificaciones técnicas y con el tiempo de operación, como se detalla en la Tabla XII.5 del Anexo XII. Se estableció un costo de 24,93 dólares por lote de producción, al considerar un valor promedio de 0,21 dólares el kWh para el sector industrial del Ecuador (Empresa Eléctrica Quito, 2014, p. 7).

3.8.4. COSTO DE LA MATERIA PRIMA E INSUMOS

En la Tabla 3.25 se resumen los costos de la materia prima e insumos requeridos para producir 5 L/d de extracto semipurificado con actividad inhibidora de papaína y quimotripsina.

Tabla 3.25. Costos de la materia prima e insumos requeridos para producir 5 L/d de extracto con actividad inhibidora de papaína y quimotripsina

Parámetro	Costo unitario (\$)	Cantidad requerida	Costo total (\$)
Semillas (kg)	3,00	13,00	39,00
1- Propanol (L)	181,07	21,63	3 916,54
Tampón fosfato de sodio (L)	2,54	58,40	148,33
Botellas (u)	0,50	5	2,50
Etiquetas (10 000 u)	454,00	5	0,23
Cajas de cartón (100 u)	50,00	1	0,50
TOTAL			4 107,08

3.8.5. COSTO DE MANO DE OBRA DIRECTA E INDIRECTA

Se estableció una estructura organizacional que se detalla en la Figura AXII.1 del Anexo XII, en la cual se basa la nómina de trabajadores que se presenta en la Tabla 3.26. El costo de mano de obra directa e indirecta anual será de 106 782,00 dólares, y al trabajar 200 días laborales al año, el costo de mano de obra por lote será de 533,91 dólares.

Tabla 3.26. Salarios anuales de los trabajadores de la planta piloto

Cargo que ocupa	Salario mensual	Aporte patronal IESS	Vacaciones	13 ^{ro}	14 ^{to}	Total anual
Gerente general	1 600,00	178,40	800,00	1 600,00	354,00	21 954,00
Jefe de producción	1 450,00	161,68	725,00	1 450,00	354,00	19 929,00
Jefe de laboratorio	1 350,00	150,53	675,00	1 350,00	354,00	18 579,00
Operario 1	600,00	66,90	300,00	600,00	354,00	8 454,00
Operario 2	600,00	66,90	300,00	600,00	354,00	8 454,00
Analista 1	700,00	78,05	350,00	700,00	354,00	9 804,00
Analista 2	700,00	78,05	350,00	700,00	354,00	9 804,00
Secretaria	700,00	78,05	350,00	700,00	354,00	9 804,00
TOTAL						106 782,00

3.8.6. RESUMEN DE LA ESTIMACIÓN DEL COSTO DE PRODUCCIÓN

Finalmente, para determinar el costo de producción de 5 L/d de extracto semipurificado con actividad inhibidora de papaína y quimotripsina, a escala piloto, se sumaron las cantidades que se presentan en la Tabla 3.27. A estos valores se agregó un fondo de adicionales del 5 %, para cubrir algunos rubros imprevistos, en la presente determinación de costos.

Tabla 3.27. Costo de producción de 5 L/d de extracto semipurificado con actividad inhibidora de papaína y quimotripsina

Parámetro	Valor (\$)
Amortización por lote de la planta piloto	124,82
Consumo de energía	24,93
Costo de materia prima e insumos	4 107,08
Costo de mano de obra directa e indirecta	533,91
Fondo de adicionales (5 %)	239,54
TOTAL	5 030,34

Al dividir el costo total por lote para la cantidad de extracto producido se obtiene que costará 1,006 \$/mL y al tomar como referencia el extracto semipurificado de fréjol, por ser el de menor concentración proteica, con 7,49 mg/mL, se estableció que el costo por mg de extracto semipurificado será de \$ 0,134.

Echeverría (2014) determinó un valor de \$ 24,46 para 17,05 mg de extracto inhibidor parcialmente purificado de sangorache; es decir, un valor por mg de \$1,43 (p. 95). Este costo es 10 veces mayor al que se determinó en el presente estudio. La diferencia radica, principalmente, en la escala de producción; Echeverría obtuvo el extracto inhibidor a escala de laboratorio, que por su naturaleza, este sistema de producción prioriza el nivel de pureza de la muestra sobre los costos de producción. Otros factores importantes que influyeron en la diferencia del costo, son la concentración del inhibidor, el grado de pureza las etapas seleccionadas en la estrategia de purificación.

La firma comercial Sigma Aldrich oferta un inhibidor de tripsina y quimotripsina aislado de semilla de soya, a un precio de \$ 5,35 /mg. El proceso de obtención del inhibidor es similar al de este estudio, su uso es para investigación, la presentación de venta es en solución de 10 mg/mL, congelada a -20 °C. Al comparar el costo del inhibidor de Sigma Aldrich frente al costo del extracto semipurificado de la presente investigación, existe un margen que permitiría

implementar otras técnicas de purificación de alta resolución, que complementen el trabajo y aun así ser comercialmente competitivos.

La farmacéutica estadounidense Abbott, produce y vende una mezcla de inhibidores (Lopinavir/Ritonavir, 200/50 mg), con el nombre comercial Kaletra®, en países como Ecuador, Colombia y Perú. Según el estudio desarrollado por Achan (2012) este medicamento disminuyó la incidencia de malaria en un 60 % (p. 2 110). El precio de este fármaco en Ecuador es de \$ 24,83, cada capsula; es decir, que el valor por mg es \$ 0,124. El fármaco que oferta Abbott se produce a escala industrial; sin embargo, el precio de venta es similar al costo que se determinó, a escala piloto, en la presente investigación. Este análisis permite concluir que al aumentar la producción de los inhibidores en estudio se disminuirían los costos de producción y se convertiría en un fármaco competitivo, incluso en mercados internacionales.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron extractos crudos de las semillas de amaranto, arveja, chocho, fréjol y sangorache mediante homogeneización con tampón fosfato de sodio 50 mM, y ultrafiltración centrífuga a 50 kDa.
2. Los extractos crudos provenientes de las semillas de las cinco especies ensayadas produjeron AIE frente a papaína y quimotripsina. Mientras que, frente a carboxipeptidasa A no existió AIE, incluso con variaciones de la cantidad de enzima y extracto inhibidor. Los mejores resultados correspondieron a los extractos de fréjol frente a papaína con un valor de $4,95 \pm 0,15$ y chocho frente a quimotripsina con un valor de $2,19 \pm 0,06$ U/mg.
3. La purificación de los extractos crudos de fréjol y chocho mediante ultrafiltración centrífuga a 10 kDa y tratamiento calórico produjo un grado de purificación de 2,91 y 3,02 veces en cada extracto. Así también la purificación por cromatografía de afinidad en una matriz de tripsina-glioxil-sepharosa 6B-CL generó un grado de purificación para el extracto de fréjol de 1,53 veces y para el extracto de chocho de 1,13 veces. Sin embargo, este último procedimiento diluyó excesivamente la muestra y dificultó su posterior caracterización.
4. Los pesos moleculares de los inhibidores fueron determinados mediante electroforesis SDS- PAGE, cuyos resultados fueron 5,18 kDa para el inhibidor de chocho y 4,05 kDa para el de fréjol.
5. Los valores de IC_{50} encontrados para los extractos de fréjol ($0,107 \pm 0,021$ mM) y chocho ($0,018 \pm 0,0012$ mM), frente a papaína y quimotripsina, respectivamente, muestran un elevado nivel de inhibición, debido a que

- representan una buena afinidad entre el inhibidor y la enzima correspondiente.
6. El estudio de estabilidad demuestra que el almacenamiento debe realizarse a temperatura de congelamiento, puesto que con el extracto semipurificado de fréjol no se encontraron diferencias significativas de AI; mientras que, con el extracto de chocho la disminución de AI fue apenas del 15 %.
 7. El procedimiento que se propuso para la purificación de los extractos inhibidores permite el diseño de una planta a escala piloto para la obtención de 5 L/d de extractos semipurificados de fréjol y chocho con AI, que serviría para satisfacer la producción de un posible medicamento contra la malaria en Ecuador.
 8. El costo de producción a escala piloto de los extractos semipurificados se estimó en \$ 0,134/mg, que frente a precios de inhibidores comerciales posee un margen que permitiría implementar otras técnicas de purificación de alta resolución y aún así ser competitivos.

4.2. RECOMENDACIONES

1. Incorporar una etapa en la estrategia de purificación de los inhibidores, consistente en una precipitación selectiva, hasta identificar la fracción con actividad inhibidora.
2. Determinar la actividad inhibidora de los extractos frente a papaína, quimotripsina y CPA, con sustratos específicos para cada enzima y, además, probar la actividad inhibidora de los extractos frente a pepsina por ser una aspártico proteasa representativa y de una clase mecanística diferente a las proteasas estudiadas.
3. Inmovilizar papaína, quimotripsina y CPA, de manera independiente, en una matriz de Sepharosa para lograr un mayor grado de purificación de los inhibidores, mediante cromatografía de afinidad.
4. Determinar la estabilidad de los extractos de fréjol y chocho almacenados a temperatura de congelamiento (-20 °C), durante un periodo mayor a cuatro semanas.
5. Evaluar la actividad antimalárica, *in vitro*, de los extractos de fréjol, chocho y sangorache, frente a parásitos del género *Plasmodium*.
6. Buscar nuevas aplicaciones de los inhibidores obtenidos en otros campos como la agricultura, con el desarrollo de plaguicidas específicos con mínimo impacto sobre otros organismos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Achan, J., Kakuru, A., Ikilezi, G., Ruel, T., Clark, D., Nsanzabana, C. y Kanya, M. (2012). *Antiretroviral agents and prevention of malaria in HIV-infected Ugandan children*. *New England Journal of Medicine*, 367(22), 2110-2118. Recuperado de <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1200501#t=article> (Enero, 2015).
2. Acikara, B. (2013). *Affinity Chromatography and Importance in Drug Discovery*. Recuperado de <http://www.intechopen.com/books/column-chromatography/affinity-chromatography-and-importance-in-drug-discovery> (Noviembre, 2014).
3. Aitken, A. y Laermonth, M. (2002). *Protein determination by UV absorption*. En Walker, J. (Ed.). *Protocols Handbook*. Totowa, Estados Unidos: Humana Press Inc. Recuperado de http://download.bioon.com.cn/upload/month_0810/20081028_b89a5bd42d711d37fb77m6aaG8vGhQjS.attach.pdf. (Junio, 2014)
4. Ajamhassani, M., Zibaee, A., Sendi, J., Askary, H. y Farrar, N. (2012). *Proteolytic activity in the midgut of the crissal moth *Utethesia Pulchella* L. (Lepidoptera: Arctiidae)*. *Journal of Plant Protection Research*, 52(3), 368-373. Recuperado de http://www.plantprotection.pl/PDF/52%283%29/JPPR_52%283%29_13_Ajamhassani.pdf (Marzo, 2014)
5. Aliaga, P. (2007). *Efecto del desgrasado sobre la actividad del inhibidor de tripsina en raíces de camote*. *Anales científicos de la Universidad Nacional Agraria La Molina*, 68(2), 95 - 97. Recuperado de <http://www.la.molina.edu.pe/Investigacion/web/anales/2007/2.pdf> (Septiembre, 2014).

6. Almécija, M. (2007). *Obtención de lactoferrina bovina mediante ultrafiltración de lactosuero*. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, Granada, España. Recuperado de <http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/1721/1/17243518.pdf> (Enero, 2014).
7. Alvarado, P. (2012). *Caracterización de exoantígenos y proteasas de Histoplasma capsulatum obtenidos en cultivos*. Recuperado de <http://159.90.80.55/tesis/000155772.pdf> (Marzo, 2014).
8. Álvarez, C. (2005). *Purificación de proteínas*. Recuperado de <http://ufq.unq.edu.ar/Docencia-Virtual/Bioquimical/Teorias/T15-Purificacion.pdf> (Marzo, 2014).
9. Anaya, A. y Pedraza, H. (2008). *Escalamiento, el arte de la ingeniería química: plantas piloto*. Tecnología, Ciencia, Educación, 23(1), 31-39. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=48223105> (Diciembre, 2014).
10. ANFAB. (2014). *Tabla de composición de alimentos*. Recuperado de <http://www.anfab.com/wp/?p=477> (Enero, 2015).
11. Arévalo, M. y Díaz, J. (2010). *Evaluación económica de ocho especies de leguminosas herbáceas nativas, identificadas como potenciales fijadoras de nitrógeno atmosférico*. Recuperado de <http://www.secsuelo.org/XIICongreso/Simposios/Microbiologia/Ponencias/9.%20Jose%20Francisco%20Guaman.%20leguminosas.%20Loja.pdf> (Diciembre, 2014).
12. Arroyo, M. (1998). *Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones*. Lars Pharmaceutica, 39(2), 23-39. Recuperado de <http://www.innovacion.gob.sv/inventa/attachments/article/1582/arroyo.pdf> (Febrero, 2014).

13. Avendaño, C. (2009). *Inhibidores de proteasas*. Recuperado de <http://www.analesranf.com/index.php/ie/article/view/851/821> (Enero, 2014).
14. Becker, K., Makkar, M. y Siddhuraju, P. (2007). *Plant Secondary Metabolites*. Recuperado de http://www.beck-shop.de/fachbuch/leseprobe/9781588299932_Excerpt_001.pdf. (Enero, 2014).
15. Benítez, A. (2005). *Avances recientes en biotecnología vegetal e ingeniería genética de plantas*. Recuperado de <http://books.google.com.ec/books?id=3kVFGjfMssAC&hl=es> (noviembre, 2013).
16. Bernal, J. (2005). *Ingeniería del diseño*. Recuperado de <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/6837/05Jcb05de16.pdf;jsessionid=FA1E80D9DB1F25A72D3413EFA33EE14B.tdx1?sequence=5> (Diciembre, 2014).
17. Betancur, D., Guerrero, L., Hernández, V. y Marrufo, D. (2012). *Inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina I con hidrolizados proteicos de Jatropha curcas*. *Bioquímica clínica latinoamericana*, 46(3), 385 – 393. Recuperado de <http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v46n3/v46n3a06.pdf> (Septiembre, 2014)
18. Bio-Rad. (2013). *Instruction manual model 385 gradient former*. Recuperado de http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_9113.pdf (Septiembre, 2014).
19. Blanco, A. y Aguirre, C. (2002). *Proteínas involucradas en los mecanismos de defensa de las plantas*. Recuperado de <http://www.actauniversitaria.ugto.mx/index.php/acta/article/viewFile/276/254> (Febrero, 2014)
20. 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.

21. 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 (Octubre, 2014)
22. Caicedo, C. y Peralta, E. (2012). *Chocho, fréjol y arveja, leguminosas de grano comestible con un gran mercado potencial en Ecuador*. Recuperado de http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/Mercado_potencial_leguminosas_granos_andinos_Ecuador.pdf (Octubre, 2014)
23. Caps, A. (2005). *Diseño de industrias agroalimentarias*. Madrid, España: Mundi-Prensa.
24. Chagaray, A. (2005). *Estudio de factibilidad del cultivo de amaranto*. Recuperado de http://www.academia.edu/7599720/Estudio_de_Factibilidad_del_Cultivo_del_Amaranto (Diciembre, 2014).
25. Chassaing, J. (2001). *Malaria y fármacos antimaláricos*. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 21 (2), 85-88. Recuperado de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562001000200017&lng=es&nrm=iso. (Noviembre, 2014).
26. Chávez, M., Delfín, J., Díaz, D., Díaz, J., González, E., Guitart, B., Peralta, N. y Rivero, A., (2003). *Detección de actividad inhibidora de carboxipeptidasa A en diferentes organismos marinos*. Biología, 17(2), 80-85. Recuperado de <http://biblat.unam.mx/es/revista/revista-biologia-la-habana/articulo/deteccion-de-actividad-inhibidora-de-carboxipeptidasa-a-en-diferentesorganismos-marinos> (Mayo, 2014).

27. Chávez, M., Fernández, A., Guerra, Y., Hernández, A., Martínez, J., Morales, M., Rojas, L. y Valdés, O. (2008). *Evaluación de la actividad de extractos marinos sobre Plasmodium falciparum in vitro y aspártico proteasas*. Revista Cubana de Medicina Tropical, 60(3), 24-33. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0375-07602008000300001&script=sci_arttext (Mayo, 2014).
28. Chávez, M., González, Y., Hernández, A., Pascual, I., Reytor, M. y Rivero, M. (2011). *Screening of protease inhibitory activity in extracts of five Ascidian species from Cuban coasts*. Biotecnología Aplicada, 28(2), 77 – 82. Recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/bta/v28n2/bta02211.pdf> (Octubre, 2014).
29. Conlan, R. (2000). *El desarme de un virus mortal: proteasas y sus inhibidores*. Recuperado de http://www7.nationalacademies.org/spanishbeyonddiscovery/EI%20desarme%20de%20un%20virus%20mortal_%20las%20proteasas%20y%20sus%20inhibidores.html (Enero, 2015).
30. Copeland, R., Lombardo, D., Giannaras, J. y Decicco, C. (1995). *Estimation IC_{50} values from the inhibition constant*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 5 (17), 1947-1952.
31. 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.
32. Echavarría, B., Martínez, A. y Zabala, D. (2008). *Actividad inhibitoria sobre la enzima dihidrofolato reductasa de extractos de esponjas marinas del golfo de Uraba*. VITAE, 15(2), 285-289.
33. 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 Título de Ingeniera Química no publicado). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.

34. Elizalde, A., Porilla, Y. y Chaparro, D. (2009). *Factores antinutricionales en semillas*. Facultad de ciencias agropecuarias, 7(1), 46. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v7n1/v7n1a07.pdf> (Noviembre, 2014).
35. El-Yassin, H. (2012). *Enzymes assay*. Recuperado de <http://www.comed.uobaghdad.edu.iq/uploads/Lectures/Biochemistry/biochemistry.pdf> (Agosto, 2014).
36. Empresa Eléctrica Quito. (2013). *Pliego tarifario*. Recuperado de <http://200.93.231.248/upload/pliegos/20130108114800.pdf> (Diciembre, 2014).
37. ESPAC. (2013). *Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua ESPAC 2013*. Recuperado de http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/webinec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac%202013/PRESENTACIONESPAC2013.pdf (Diciembre, 2014).
38. Espinoza, C. y Quispe, M. (2011). *Tecnología de cereales y leguminosas*. Recuperado de <http://maqsolano.files.wordpress.com/2012/08/texto-de-tecnologia-de-cereales-y-leguminosas.pdf> (Diciembre, 2014).
39. Fagáin, C. (2013). *Gel filtration Chromatography*. Recuperado de http://doras.dcu.ie/17808/1/Gel_Filtration_Chapter%2711.pdf (Enero, 2015).
40. FDA. (2014). *Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection*. Recuperado de <http://www.fda.gov/ForPatients/Illness/HIVAIDS/Treatment/ucm118915.htm> (Enero, 2015).

41. Feijoo, L. y Villa, T. (2010). *Native and Biotechnologically Engineered Plant Proteases with Industrial Applications*. Food bioprocess Technol, 1(4), 1066 – 1088. doi: 10.1007/s11947-010-0431-4.
42. Félix, R. (2008). *Aislamiento, purificación y caracterización de proteasas de origen vegetal, a partir de muestras de hierba mora (Solanum nigrum) e Higuerón (Ficus apollinaris)*. (Proyecto de titulación previo a obtención del Título de Ingeniero Químico). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.
43. Fernández, E. y Galván, A. (2006). *Métodos para la cuantificación de proteínas*. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Rabanales. Cordoba, España (Agosto, 2014).
44. Fersht, A. (1998). *Mecanismo y estructura de las enzimas*. (4ta. ed.). Barcelona, España: Reverté.
45. FUNIBER. (2014). *Base de datos internacionales de composición de alimentos*. Recuperado de <http://composicionnutricional.com/alimentos/FREJOL-SECO-5> (Enero, 2015).
46. García, P., (2000). *Electroforesis en geles de poliacrilamida: Fundamentos, actualidad e importancia*. UNIV DIAG, 1(2), 31-41. Recuperado de http://bvs.sld.cu/revistas/uni/vol1_2_00/uni07200.pdf (Enero, 2015).
47. García, 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. Recuperado de <http://www.fisica.uh.cu/biblioteca/revcubfi/2009/vol.26No.1/RCF-26-1-2009-76.pdf> (Noviembre, 2013).
48. Gómez, A. (2013). *Selección de un proceso de transformación para la disminución de compuestos antinutricionales en el grano y hojas de*

amaranto (Amaranthus candatus L.) y sangorache (Amaranthus hybridus L.). (Proyecto de titulación previo a obtención del Título de Ingeniera Agroindustrial no publicado). Escuela Politécnica Nacional. Quito. Ecuador.

49. González, L., Gutiérrez, M. y Fuchs, M., (2001). *Estandarización de la metodología para caracterizar genotipos de algodón (Gossypium sp.) mediante patrones electroforéticos de proteínas*. *Rev. Fac. Agron.*, 27(8), 95-103. Recuperado de http://revistaagronomiaucv.org.ve/revista/articulos/2001_27_2_3.pdf (noviembre, 2014).
50. Gragera, R. y Martínez, R. (2008). *Fundamentos teóricos y prácticos de la histoquímica*. Recuperado de <https://editorial.csic.es/publicaciones/libros/11444/978-84-00-08672-5/fundamentos-teoricos-y-practicos-de-la-histoquimic.html> (marzo, 2014).
51. Habib, H. y Fazili, K. (2007). *Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants*. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 2(3), 68-85. Recuperado de http://www.academicjournals.org/article/article1380100578_Habeeb%20and%20Khalid.pdf (Enero, 2014).
52. Havlíček, V. y Novák P. (2013). *Protein extraction and precipitation*. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-59378-8.00004-9> (Octubre, 2014).
53. Hernández, E., Jiménez, A., Jiménez, E., Zapata, E. y Zamilpa, A. (2009). *Inhibición de la enzima convertidora de angiotencina por extractos de tejocote (crataegus mexicana moc. sessé)*. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Morelos, México. Recuperado de http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/acapulco09/TRABAJOS/AREA_VIII/CVIII-04.pdf (Mayo, 2014).
54. Hernández, M., Castillo, P., Covalada, G., Trejo, S. y Avilés, X. (2013). *Kinetics identification and proteomics of protease inhibitors from Latin-*

- American plants. Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal.* Ciego de Ávila, Cuba. Recuperado de www.bioplantas.cu (Octubre, 2014).
55. Herrera, S. y Montenegro, A. (2012). *El amaranto prodigioso alimento para la longevidad y la vida.* Kapana, 8(1), 50-66. Recuperado de <http://www.uct.edu.ec/PicsBoletines/DICIEMBRE%202012/KALPANA%20REVISTA%208.pdf> (Diciembre, 2014).
56. Hoftman, E. y Stroobant, V. (2007). *Mass Spectrometry: principles and applications.* (3ra. Ed.). West Sussex, Inglaterra: Jhon Wiley and sons, Ltd. Recuperado de [http://www.usp.br/massa/2014/qfl2144/pdf/Mass Spectrometry.pdf](http://www.usp.br/massa/2014/qfl2144/pdf/MassSpectrometry.pdf) (Noviembre, 2014).
57. Kakade, M., Simons, N. y Liener, I., (1969). *An evaluation of natural vs. synthetic substrates for measuring the Antitryptic Activity of Soybean Samples.* Cereal Chemistry, 4(6), 518-596. Recuperado de http://www.aacnet.org/publications/cc/backissues/1969/Documents/chem46_518.pdf (Julio, 2014).
58. Laemmli, U. K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 227(5259), 680-685.
59. Lee, B. (1996). *Fundamentos de biotecnología de los alimentos.* Zaragoza, España: ACRIBIA S. A.
60. 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> (Octubre, 2014).
61. Miranda, J. (2004). *El desafío en la gerencia de proyectos.* Recuperado de <https://books.google.es/books?id=Xx2CrC6liM0C&pg=PA279&dq=ingenieria+conceptual&hl=es&sa=X&ei=Hxa9VMWnKoy0ggTLg4O4Cg&ved=0>

CCIQ6AEwAA#v=onepage&q=ingenieria%20conceptual&f=false (Enero, 2015).

62. Molina, D. (2010). *Aislamiento, purificación y caracterización de un inhibidor de aspártico proteasa vegetal específico contra las aspártico proteasas de la broca del café*. Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/3103/1/197933.2010.pdf> (Octubre, 2014).
63. Morales, L. y Troncoso A. (2012). *Sustancias antinutritivas presentes en alimentos*. Recuperado de http://books.google.com.ec/books?id=hLMEZfbh4OMC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false. (Noviembre, 2013).
64. Mosquera, E. (1999). *Obtención de hidrolizado enzimático de proteína de chocho (*Lupinus Mutabilis*) a escala semi piloto. Determinación de las propiedades físico químicas y funcionales*. (Proyecto de titulación previo a obtención del Título de Ingeniera Química). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.
65. Mujica, A., Berti, M. e Izquierdo, J. (1997). *El cultivo del amaranto (*Amaranthus spp*) producción, mejoramiento genético y utilización*. Recuperado de <http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro01/home1.htm> (Diciembre, 2014).
66. Muñoz, F. (2011). *Aislamiento y purificación parcial de los inhibidores de tripsina presentes en semillas de leguminosas o gramíneas producidas en el Ecuador*. (Proyecto de titulación previo a la obtención del Título de Ingeniero Agroindustrial). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.
67. Nelson D. y Cox, M. (2009). *Principles of biochemistry*. Recuperado de <http://www.irb.hr/users/precali/Znanost.o.Moru/Biokemija/Literatura/Lehninger%20Principles%20of%20Biochemistry,%20Fourth%20Edition%20->

- %20David%20L.%20Nelson,%20Michael%20M.%20Cox.pdf (Junio, 2014).
68. Páez, O. (2013). *Día del paludismo*. Recuperado de <http://www.salud.gob.ec/tag/snem/> (marzo, 2014)
69. Peralta, E., Mazón, N., Murillo, A., Rivera, M., Rodríguez, D., Lomas, L. y Monar, C. (2012). *Manual Agrícola de Granos Andinos: Chocho, Quinoa, Amaranto y Ataco. Cultivos, variedades y costos de producción*. Recuperado de <http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/MANUAL%20AGRICOLA%20GRANOS%20ANDINOS%202012.pdf> (Diciembre, 2014).
70. Peralta, E., Murillo, M., Mazón, A., Monar, C., Pinzon, J. y Rivera, M. (2010). *Manual Agrícola de fréjol y otras leguminosas*. Recuperado de <http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/MANUAL%20FREJOL%20Y%20LEGUMIN%202010.pdf> (Diciembre, 2014).
71. Perry, R. y Gree, D. (1999). *Perry's Chemical Engineers Handbook*. Recuperado de <http://files.rushim.ru/books/spravochniki/Perrys-Chemical-Engineers-handbook-1999.pdf> (Enero, 2015).
72. Primo, E. (2005). *Química básica y aplicada*. Recuperado de http://books.google.com.ec/books?id=aU_aBXvAB3MC&pg=PA1022&lpg=PA102&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false (Enero, 2015).
73. Quijano, G. (1995). *Planta piloto*. Recuperado de <http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/4324/Capitulo10.pdf> (Diciembre, 2014).
74. Quinchuela, L. (2013). *Inmovilización de tripsina en sepharosa*. (Proyecto de titulación previo a la obtención Título de Ingeniera Química). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.

75. Rawlings, N., Morton, F., Kok, C. y Barrett, A. (2008). *MEROPS: The peptidase database*. Recuperado de http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/family_index?type=P (Enero, 2015).
76. Reina, J. (2000). *Separación de fracciones de lipasa de *Cándida rugosa* con distintas propiedades en química fina por cromatografía de adsorción interfacial a soportes octil agarosa*. Universidad Autónoma de Madrid. España.
77. Sapag, N. y Sapag, R. (2003). *Preparación y evaluación de proyectos*. (4ta. Ed.). México, México: Mc Graw Hill.
78. Sierra, J. (2005). *Fundamentos para el establecimiento de pasturas y cultivos forrajeros*. Recuperado de https://books.google.com.ec/books?id=rbezH_RPHVYC&pg=PA152&lpg=PA152&dq=fundamentos+para+el+establecimiento+de+pasturas+y+cultivos+forrajeros&source=bl&ots=_7d89KsPZq&sig=pRPPhfMSegRnswmCXmCAHRCqXHA&hl=es&sa=X&ei=dxLBVMzsH8yVNvvVgZAD&ved=0CBwQ6AEwAA#v=onepage&q=fundamentos%20para%20el%20establecimiento%20de%20pasturas%20y%20cultivos%20forrajeros&f=false (Diciembre, 2014)
79. Sigma-Aldrich. (2006). *Trichloroacetic acid SigmaUltra*. Recuperado de https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/SigmaAldrich/Product_Information_Sheet/t9159pis.pdf (Julio, 2014).
80. Sigma-Aldrich. (2013). *Enzymatic Assay of PAPAIn*. Recuperado de https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/SigmaEnzyme_Assay/p4762enz.pdf (Febrero, 2014).
81. Sigma-Aldrich. (2014). *Aldrich chemistry products*. Recuperado de <http://www.sigmaaldrich.com/chemistry/chemical-synthesis/chemical-synthesiscatalog.html> (Agosto, 2014).

82. Sigma-Aldrich. (2014). *Universal protease assay: casein as a substrate*. Recuperado de <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/learning-center/life-science-video/universal-protease.html> (Marzo, 2014).
83. Smith, R. (2005). *Chemical Process Design and Integration*. New York, Estados Unidos: John Wiley.
84. Soto, L., Gutiérrez, R. y Seas, C. (2005). *Inhibidores de proteasas (IPs)*. Recuperado de <http://www.upch.edu.pe/tropicales/telemedicinatarga/REVISION%20DE%20TEMAS/IP%20FINAL.pdf> (Junio, 2014).
85. Thermo Electron Corporation. (2004). *Instruction manual mini vertical gel system 120-2 gel and 120-4 gel*. Recuperado de http://www.frankshospitalworkshop.com/equipment/documents/laboratory_equipment/user_manuals/electrophoresis/Thermo%20Mini%20Vertical%20Gel%20System%20120%20-%20User%20manual.pdf (Febrero, 2014).
86. Vera, L. (2007). *Enzimas: Qué son y Para qué sirven*. *Revista Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 101(2). Recuperado de <http://www.rac.es/ficheros/doc/00552.pdf>, (Noviembre, 2013).
87. Vita, C. (2014). *Métodos de purificación de proteínas*. Recuperado de <http://catedras.quimica.unlp.edu.ar/ingenieriabioquimicalyII/seminariostp/V-purificacioncromatografia.pdf> (Enero, 2015)
88. Vivanco, J., Cosio, E., Loyola, V. y Flores, H. (2005). *Mecanismos químicos de defensa de las plantas*. *Investigación y ciencia*, 341(2), 68-75. Recuperado de <http://www.agro.unlpam.edu.ar/catedras-pdf/Investigacion2005.pdf> (Febrero, 2014).
89. Voet, J. y Voet, D. (2006). *Bioquímica*. (3ra. ed.). Uruguay: Editorial Medica Panamericana.

90. Walker, V. (2009). *Designing a Process Flowsheet*. Recuperado de <http://coade.typepad.com/coadeinsider/2009/06/CEP-May-09-Piping-and-Instrument-Diagrams-COADE.pdf> (Enero, 2015).
91. Worthington. (2012). *Chymotrypsin*. Recuperado de: <http://www.worthington-biochem.com/try/cat.html> (Enero, 2015).
92. Zamora, N., (2003). *Efecto de la extrusión sobre la actividad de factores antinutricionales y digestibilidad in vitro de proteínas y almidón en harinas de Canavalia ensiformis*. Recuperado de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0004-06222003000300012&script=sci_arttext (Octubre, 2014)

ANEXOS

ANEXO I

EJEMPLOS DE CÁLCULO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

AI.1. MÉTODO DE ABSORCIÓN EN EL ULTRAVIOLETA

Para la determinación de la concentración proteica mediante el método de absorción en el ultravioleta se midió la absorbancia a 280 nm. El cálculo de la concentración de proteína se realizó mediante la Ecuación 2.1 según lo descrito en el acápite 2.2.3.1.

$$[P] = \frac{DO_{280} \times f}{\varepsilon \times L} \quad [2.1]$$

Fue necesario hacer una dilución 1:20 para obtener lecturas menores a 1; para el valor de L se tomó la medida de la celda, que es 1 cm; y para el coeficiente de extinción se consideró un valor arbitrario de $1,0 \text{ (mg/mL)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Aitken y Learmonth, 2002, p. 3). A continuación se muestra un ejemplo de cálculo de la concentración de proteína del extracto crudo de fréjol.

$$[P] = \frac{0,576 \times \frac{20}{1 \text{ cm}}}{1 \text{ (mg/mL)}^{-1} \text{ cm}^{-1}} = 11,51 \text{ mg/mL}$$

AI.2. MÉTODO DE BIURET

Para la determinación de la concentración proteica mediante el método de Biuret fue necesario realizar una curva de calibración con una solución estándar de albúmina bovina (20 mg/mL) y con la ecuación de la línea de tendencia se determinó la concentración de proteína en mg/mL, de los extractos en todas las etapas de purificación, según lo descrito en acápite 2.2.3.2.

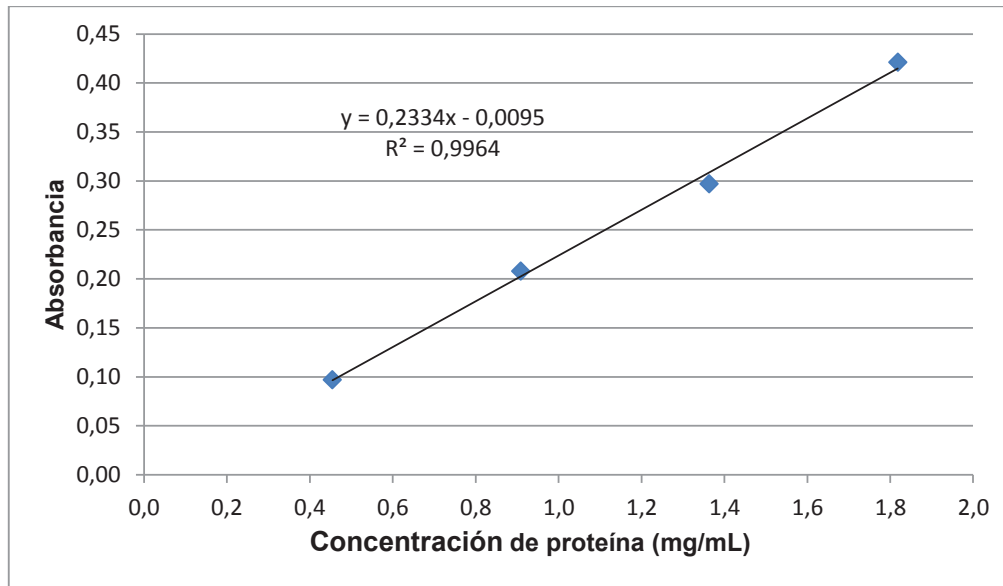


Figura AI.1. Curva de calibración para la determinación de la concentración de proteína en mg/mL, por el método de Biuret

En la ecuación de la línea de tendencia que se observa en la Figura AI.1 se reemplazaron los valores de absorbancia a 545 nm de los extractos. El caso particular de la determinación de proteína del extracto crudo de fréjol se muestra a continuación:

$$y = 0,2334x - 0,0095$$

$$1,92 = 0,2334x - 0,0095$$

$$x = 8,238 \text{ mg/mL}$$

La concentración de proteína del extracto crudo de fréjol determinado por el método de Biuret fue 8,238 mg/mL.

ANEXO II

EJEMPLOS DE CÁLCULO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE TRIPSINA, MÉTODO DESARROLLADO POR BECKER, MAKKAR Y SIDDHURAJU, PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE QUIMOTRIPSINA, DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA ESPECÍFICA

AII.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE TRIPSINA, CON BApNA, COMO SUSTRATO

La actividad proteolítica de la tripsina se determinó mediante espectrofotometría, según el método desarrollado por Earlanger et al. (1961) modificado por Muñoz (2011), que utiliza BApNA como sustrato. Para calcular la actividad proteolítica de la tripsina se utilizó la Ecuación 2.2 (Reina, 2000).

$$AE = \frac{\Delta DO_{400}}{\Delta t} \times \frac{1\,000 \times V_T}{\epsilon \times L \times V_e} \quad [2.2]$$

$$AE = 0,105 \times \frac{1\,000 \times 3\,200}{8\,800 \times 1 \times 100} = 0,382 \text{ U/mL}$$

La AE de la tripsina fue de 0,382 U/mL que equivale a 382 mU/mL.

AII.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA FRENTE A TRIPSINA PRODUCIDA POR EL EXTRACTO CRUDO DE SEMILLAS DE SANGORACHE, CON CASEÍNA COMO SUSTRATO

Se realizó la determinación espectrofotométrica de los productos de degradación de caseína a 275 nm producidos por una concentración dada de la proteasa en

experimentación, en presencia y ausencia del inhibidor, según lo descrito en el acápite 2.3.1.3. La actividad enzimática de tripsina, con caseína como sustrato, se calculó mediante la Ecuación 2.3 como se indica a continuación:

$$A_c = \frac{h}{(0,1)^2} \quad [2.3]$$

El promedio de las lecturas de absorbancia a 275 nm fue de 0,6474 con este valor se aplicó la Ecuación 2.3.

$$A_c = \frac{0,6474}{(0,1)^2} = 64,74 \text{ U/mL}$$

AIL.3. MÉTODO DESARROLLADO POR BECKER, MAKAR Y SIDDHURAJU, PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE QUIMOTRIPSINA

1. Principio del ensayo

Este método se basa en la determinación espectrofotométrica de los productos de degradación de caseína, a 280 nm, producidos por una determinada concentración de la proteasa, en presencia y en ausencia del inhibidor.

2. Materiales

- a) Tampón fosfato de sodio, 50m M y pH 7,5.

- b) Solución de caseína (1 %): Suspender 1 g de caseína en 80 mL del tampón fosfato de sodio, 50 mM, pH 7,5; disolver completamente con calentamiento, en un baño termostático, durante 15 min. Enfriar esta

solución, ajustar el pH a 7,5 y completar el volumen, con la solución tampón hasta 100 mL.

- c) Solución enzimática (40 mg/mL): Disolver 4 mg de quimotripsina en 100 mL de 0,001 M HCl que contiene 0,08 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.
- d) Reactivo de ácido tricloroacético (TCA): Tomar 18,0 g de TCA y 18,0 g de acetato de sodio anhidro, añadir 20 mL de ácido acético glacial y completar el volumen hasta 1 L, con agua destilada.
- e) Solución de HCl (0,001 M) que contiene 0,08 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: Disolver 0,09 mL de HCl concentrado (37 % peso/volumen), en 900 mL de agua destilada. Añadir 11,76 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y aforar a 1 L.
- f) Solución de NaOH (1 M): Disolver 4 g NaOH en 100 mL de agua destilada.

3. Métodos

3.1. Determinación de la actividad enzimática

Mezclar en cuatro tubos de ensayo 0,5 mL de la solución enzimática con 0,5 mL de tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 7,5. Colocar los tubos en un baño termostático a 37 °C. En uno de los tubos añadir 3 mL de la solución con TCA, el mismo que servirá como blanco para los demás. Luego agregar en todos los tubos 1 mL de la solución de caseína, precalentada a 37 °C. Luego de exactamente 10 min terminar la reacción con 3 mL de la solución con TCA.

Después de dejar reposar a 37 °C, durante al menos 30 min, filtrar la suspensión, y medir la absorbancia del filtrado a 275 nm, frente al blanco apropiado.

3.2. Determinación de la actividad inhibidora

La actividad inhibidora se define como la diferencia de la actividad enzimática en ausencia y presencia del extracto inhibidor. Para determinar la actividad enzimática en presencia del inhibidor se reemplaza el tampón fosfato de sodio por el extracto inhibidor y se procede según lo descrito en el ítem anterior.

AII.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA ESPECÍFICA

La actividad inhibidora específica, es la relación que existe entre la actividad inhibidora que genera el extracto dividido para su concentración de proteína, de esta manera se puede determinar el grado de pureza que se obtiene en las diferentes etapas del proceso. La AIE del extracto crudo de fréjol frente a papaína se calculó mediante la Ecuación 2.4, como se ejemplifica a continuación:

$$AIE = \frac{AI}{[P]} \quad [2.3]$$

$$AIE = \frac{40,95 \text{ U/mL}}{8,23 \text{ mg/mL}} = 4,95 \text{ U/mg}$$

ANEXO III

MÉTODO PARA LA ELECTROFORESIS DE LOS EXTRACTOS CRUDOS

Tabla AIII.1. Soluciones preparadas para el análisis de electroforesis

Nombre del reactivo	Cantidad (mL)	Concentración	Componentes	Observaciones
Tris HCl pH 8,8	50	1,5 M	11,82 g Tris HCl Aforar con H ₂ O _D	Ajustar el pH con NaOH
Tris HCl pH 6,8	50	1,0 M	7,88 g Tris HCl Aforar con H ₂ O _D	Ajustar el pH con NaOH
SDS	100	10 % (p/v)	10,00 g de SDS Aforar con H ₂ O _D	Neurotóxico
Acrilamida y Bisacrilamida	50	30 % 1%	14,50 g de acrilamida 0,50 g de bisacrilamida Aforar con H ₂ O _D	Cancerígeno
Tampón de corrida 10X	500	-	1,00 g de Tris base 7,20 g de glicina 50,00 mL de SDS Aforar con H ₂ O _D	Formación de espuma
Tampón de muestra	50	-	6,25 mL de Tris HCl pH 6,8 20,00 mL de SDS al 10 % 0,25 mL de 2-mercaptoetanol 10,00 mL de glicerol 0,05 g de azul de bromofenol Aforar con H ₂ O _D	-
Solución fijadora	500	-	250,00 mL de metanol 35 mL de Ácido acético glacial Aforar con H ₂ O _D	-
Solución de coloración	500	-	0,65 g de Coomassie R250 227,00 mL de metanol 23,00 mL de Ácido acético glacial Aforar con H ₂ O _D	-
Solución decoloración	500	-	215,00 mL de metanol 75,00 mL de Ácido acético glacial Aforar con H ₂ O _D	-
Persulfato de amonio	1	10 % (p/v)	0,19 g de persulfato de amonio Aforar con H ₂ O _D	En fresco

(Felix, 2008, p. 122,123)

Los geles se polimerizaron en el espacio intermedio de dos placas de vidrio separadas por dos finas láminas. Se marcó dos centímetros desde el borde superior para señalar la separación de los geles concentrador y de corrida.

El gel separador se preparó según la secuencia que se muestra a continuación en la Tabla AIII.2.

Tabla AIII. 2 Preparación del gel separador al 15 % de acrilamida

Soluciones	Cantidad (mL)
Agua destilada	1,40
Acrilamida al 30 %	6,00
Tris HCl 1,5 M	4,50
SDS al 10 %	0,12
Persulfato de amonio al 10 %	0,08
TEMED	0,01

(Bio-Rad, 2013, p. 12; Félix, 2008, p. 124)

La mezcla se colocó en las placas de vidrio, hasta los dos centímetros medidos desde el borde superior. Luego se agregó una capa de isobutanol. La polimerización de este gel duró 1 h (Félix, 2008, p. 124).

Para preparar el gel concentrador se retiró la capa de isobutanol y se procedió según la secuencia que se muestra a continuación en la Tabla AIII.3.

Tabla AIII. 3 Preparación del gel concentrador al 4 % de acrilamida

Soluciones	Cantidad (mL)
Agua destilada	2,80
Acrilamida al 30 %	0,67
Tris HCl 1 M	0,50
SDS al 10 %	0,02
Persulfato de amonio al 10 %	0,02
TEMED	0,01

(Bio-Rad, 2013, p. 12; Félix, 2008, p. 124)

Se colocó un peine dentro de la solución, para que al polimerizar forme los pocillos donde se depositarán las muestras. La polimerización de este gel duró 45 min (Félix, 2008, p. 124).

En la preparación de las dos fases del gel, antes de agregar el persulfato de amonio y el TEMED, la mezcla se desgasificó, durante 10 min, en un baño ultrasónico.

Una vez transcurrido el tiempo de polimerización se colocó el gel, de forma vertical dentro de la cubeta de electroforesis con 880 mL de tampón de corrida 10X al 10 %, se depositaron 50 μ L de muestra y estándar, y se inició la electroforesis (Félix, 2008, p. 45; Thermo Electron Corporation, 2004, p. 8).

La corrida se desarrolló a un voltaje constante de 100 V, para el gel concentrador y de 150 V para el gel separador (González, Gutiérrez y Fuchs, 2001).

Cuando el frente electroforético llegó al borde inferior del gel separador se apagó el equipo, el gel se sumergió en la solución fijadora, luego en la de teñido y finalmente en la de decoloración, cada proceso duró 12 h (Félix, 2008, p. 125).

ANEXO IV

EJEMPLOS DE CÁLCULO PARA EL BALANCE DE ACTIVIDAD INHIBIDORA Y EL BALANCE DE CANTIDAD DE PROTEÍNA

Se realizó el balance de actividad inhibidora para calcular el porcentaje de pérdidas y el error, que se generan en el fraccionamiento mediante la filtración a 10 kDa, con relación al extracto crudo. Para el cálculo se procedió de la siguiente manera:

$$AI \text{ (U/mL)}_{E \text{ Crudo}} \times V \text{ (mL)}_{E \text{ Crudo}} = AI \text{ (U/mL)}_{\text{Permeado}} \times V \text{ (mL)}_{\text{Permeado}} + AI \text{ (U/mL)}_{\text{Retenido}} \times V \text{ (mL)}_{\text{Retenido}}$$

Actividad inhibidora de 10 mL de extracto crudo:

$$AI \text{ (U/mL)}_{E \text{ Crudo}} \times V \text{ (mL)}_{E \text{ Crudo}} = 40,95 \text{ (U/mL)} \times 10 \text{ (mL)} = 409,5 \text{ (U)}$$

Actividad inhibidora del permeado + actividad inhibidora del retenido

$$AI \text{ (U/mL)}_{\text{Permeado}} \times V \text{ (mL)}_{\text{Permeado}} + AI \text{ (U/mL)}_{\text{Retenido}} \times V \text{ (mL)}_{\text{Retenido}} = 37,22 \text{ (U/mL)} \times 9,87 \text{ (mL)} + 86,53 \text{ (U/mL)} \times 0,09 \text{ (mL)} = 375,15 \text{ (U)}$$

$$\text{Rendimiento del proceso} = (375,15 / 409,5) \times 100 = 91,61 \%$$

$$\text{Pérdidas} = 100 \% - 91,61 \% = 8,39 \% \text{ de actividad inhibidora}$$

También se realizó el balance de la cantidad de proteína de la siguiente manera:

$$[P] \text{ (mg/mL)}_{E \text{ Crudo}} \times V \text{ (mL)}_{E \text{ Crudo}} = [P] \text{ (mg/mL)}_{\text{Permeado}} \times V \text{ (mL)}_{\text{Permeado}} + [P] \text{ (mg/mL)}_{\text{Retenido}} \times V \text{ (mL)}_{\text{Retenido}}$$

Cantidad de proteína en 10 ml de extracto crudo:

$$[P] \text{ (mg/mL)}_{E \text{ Crudo}} \times V \text{ (mL)}_{E \text{ Crudo}} = 8,28 \text{ (mg/mL)} \times 10 \text{ (mL)} = 82,8 \text{ (mg)}$$

Cantidad de proteína del permeado + Cantidad de proteína del retenido

$$[P] \text{ (mg/mL)}_{\text{Permeado}} \times V \text{ (mL)}_{\text{Permeado}} + [P] \text{ (mg/mL)}_{\text{Retenido}} \times V \text{ (mL)}_{\text{Retenido}} = \\ 6,73 \text{ (mg/mL)} \times 9,87 \text{ (mL)} + 56,16 \text{ (mg/mL)} \times 0,09 \text{ (mL)} = 71,48 \text{ (mg)}$$

$$\text{Rendimiento del proceso} = (71,48 / 82,8) \times 100 = 86,33 \%$$

$$\text{Pérdidas} = 100 \% - 86,33 \% = 13,67 \% \text{ de cantidad de proteína}$$

ANEXO V

PESOS MOLECULARES DE LAS BANDAS DEL ESTÁNDAR Y SUS MOVILIDADES RELATIVAS. CÁLCULO DEL PESO MOLECULAR DE LOS EXTRACTOS SEMIPURIFICADOS DE CHOCHO Y FRÉJOL

En la Tabla AV.1 se presentan las movilidades relativas, de las 5 bandas generadas por el estándar en la electroforesis (SDS-PAGE), con respecto a la movilidad total del frente electroforético; así como también las distancias recorridas por las muestras de chocho (carril 2) y fréjol (carril 3).

Tabla AV.1 Movilidad relativa de las bandas generadas por el estándar y las bandas generadas por las muestras de chocho y fréjol, respecto al frente electroforético

Muestra	Numero de bandas	Peso molecular (kDa)	Movilidad (mm)	Movilidad total del frente (mm)	Movilidad relativa
Estándar	1	17,2	12,96	33,38	0,39
	2	14,6	20,04		0,60
	3	8,24	23,64		0,71
	4	6,38	26,77		0,80
	5	2,56	31,18		0,93
Chocho	1		25,95		0,78
	2		28,22		0,85
Fréjol	1		25,26		0,76
	2		29,68		0,89

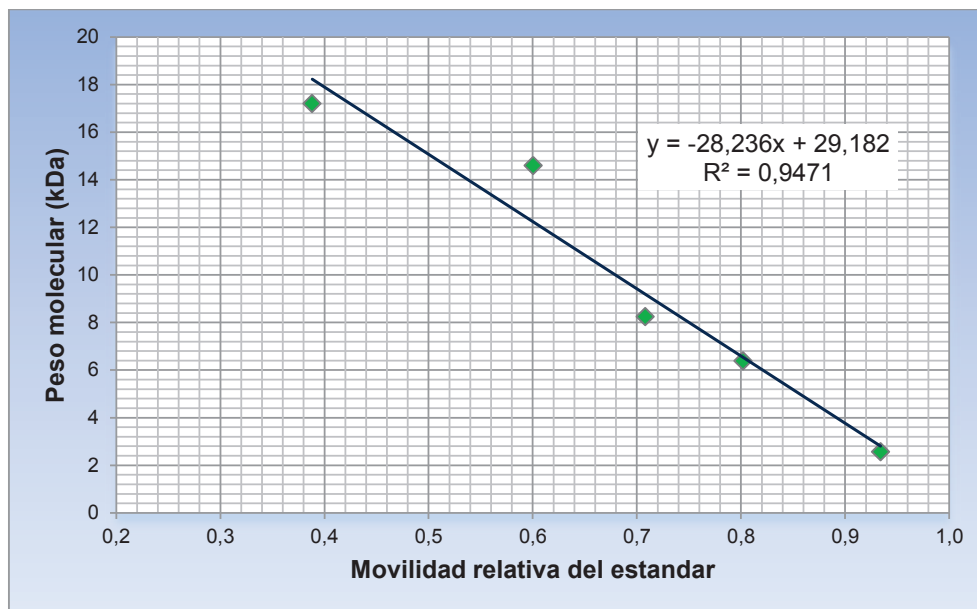


Figura AV.1 Curva de calibración del estándar aplicado en el primer carril de la electroforesis, al 20 % de poliacrilamida

Los valores de movilidad relativa de los extractos de chocho y fréjol fueron evaluados en la ecuación de linealización de la curva de calibración de los estándares, como se muestra a continuación en el siguiente ejemplo.

$$y = -28,236 x + 29,182$$

$$y = -28,236(0,78) + 29,182 = 7,16 \text{ kDa}$$

Donde

- y: Peso molecular aproximado del extracto semipurificado de chocho,
- x: Movilidad relativa del extracto de chocho con respecto a la movilidad total del frente electroforético.

ANEXO VI

CÁLCULO DEL IC₅₀ DE LOS EXTRACTOS SEMIPURIFICADOS DE FRÉJOL Y CHOCHO

AVI.1. DETERMINACIÓN DEL IC₅₀ DEL EXTRACTO SEMIPURIFICADO DE FRÉJOL, FRENTE A PAPAÍNA

Para el cálculo de Km y V_{máx} se ensayó la actividad proteolítica de papaína, sin inhibidor y con diferentes soluciones del extracto inhibidor de concentraciones 1, 3, 7 mg/mL; este procedimiento se desarrolló de acuerdo con el método descrito en el acápite 2.4.3.2.

En la Tabla AVI.1 se presenta la actividad proteolítica de papaína sin el extracto inhibidor y con el extracto inhibidor semipurificado de fréjol, a tres concentraciones.

Tabla AVI.1. Actividad proteolítica de papaína en presencia y ausencia del extracto semipurificado de fréjol a diferentes concentraciones de sustrato

Concentración de sustrato		Actividad proteolítica de papaína (U/mL)			
% (w/v)	mM	Sin inhibidor	Extracto inhibidor (mM)		
			0,035	0,104	0,243
0,5	0,042	35,51 ± 2,77 ^E	28,83 ± 1,43 ^E	19,36 ± 1,45 ^E	9,68 ± 1,02 ^E
1,0	0,085	57,82 ± 4,02 ^D	45,14 ± 2,56 ^D	28,45 ± 1,39 ^D	14,03 ± 0,63 ^D
1,5	0,127	67,21 ± 3,42 ^C	55,81 ± 4,21 ^C	40,36 ± 2,11 ^C	18,04 ± 1,21 ^C
2,0	0,169	81,96 ± 4,51 ^B	67,39 ± 5,92 ^B	44,16 ± 3,19 ^B	21,92 ± 1,66 ^B
2,5	0,212	92,08 ± 5,98 ^A	70,04 ± 4,37 ^A	46,99 ± 3,85 ^A	24,54 ± 1,49 ^A

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

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas

(Test de rangos múltiples, 95 % de confianza)

La actividad proteolítica de papaína se incrementó con la concentración de caseína en ausencia y presencia del extracto inhibidor, el comportamiento que se observa es característico del modelo cinético de Michaelis-Menten. También se

puede apreciar que las tres concentraciones de extracto inhibidor disminuyeron la actividad proteolítica de papaína en todas las concentraciones de sustrato, además existen diferencias estadísticas significativas entre las actividades a diferentes concentraciones de sustrato.

Para determinar los parámetros cinéticos K_m y $V_{m\acute{a}x}$ se calcularon los inversos de la concentración de sustrato y la actividad proteolítica de papaína, como se muestra en la Tabla AVI.2.

Tabla AVI.2. Valores inversos de la actividad proteolítica de papaína en presencia y ausencia del extracto semipurificado de fréjol a diferentes concentraciones de sustrato

1/Concentración de sustrato (mM ⁻¹)	1/Actividad proteolítica de papaína (U/mL)			
	Sin inhibidor	Extracto inhibidor (mM)		
		0,035	0,104	0,243
23,81	0,0282	0,0347	0,0517	0,1052
11,76	0,0173	0,0222	0,0351	0,0713
7,87	0,0149	0,0179	0,0248	0,0554
5,92	0,0122	0,0148	0,0226	0,0456
4,72	0,0109	0,0143	0,0213	0,0407

La gráfica de estos valores de muestra en la Figura 3.11 de la sección 3.5.2.1 en la cual se observa una tendencia lineal en los cuatro ensayos; este método fue establecido por Lineweaver-Burk para linealizar la ecuación de Michaelis-Menten.

A continuación se presenta un ejemplo de cálculo para determinar los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ para la actividad proteolítica de papaína sin inhibidor. El valor de intersección con las ordenadas (0,007) corresponde al inverso de la $V_{m\acute{a}x}$ y el valor de la pendiente (0,1 058) corresponde al coeficiente entre los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$:

$$y = 0,0009x + 0,007$$

$$\frac{1}{V_{\text{máx}}} = 0,007$$

$$V_{\text{máx}} = 142,86 \text{ U/mL}$$

$$\frac{K_m}{V_{\text{máx}}} = 0,0009$$

$$K_m = 0,129 \text{ mM}$$

De manera similar se procedió para calcular los valores de K_m y $V_{\text{máx}}$ en los ensayos con extracto inhibidor, estos resultados se muestran en la Tabla 3.14 de la sección 3.5.2.1.

Luego de la comparación de los parámetros cinéticos se determinó que el extracto semipurificado de fréjol presentó una inhibición de tipo no competitiva, frente a papaína, con caseína como sustrato; pues la $V_{\text{máx}}$ disminuyó significativamente mientras que K_m no mostró cambios considerables, este comportamiento señala que la sustancia inhibidora se une a la enzima en un sitio distinto al centro activo formando un complejo inactivo enzima-inhibidor, impidiendo así la formación del producto.

Para determinar la constante de inhibición (K_i'), que para este estudio corresponderá más bien al valor de IC_{50}' , es necesario primero determinar el valor de α' , que es el factor que relaciona la $V_{\text{máx}}$ calculada en ausencia de inhibidor con la $V_{\text{máx}}$ en presencia del inhibidor o también denominada $V_{\text{máx}} \text{ aparente}$. A continuación se presenta un ejemplo de cálculo para α' correspondiente al ensayo con la menor concentración de inhibidor.

$$V_{\text{máx aparente}} = \frac{V_{\text{máx}}}{\alpha'} \quad (\text{Nelson y Cox, 2009, p. 210}).$$

$$\alpha' = \frac{V_{\text{máx}}}{V_{\text{máx aparente}}}$$

$$\alpha' = \frac{142,86}{111,11} = 1,29$$

Del mismo modo se calcularon los otros dos factores para las concentraciones de 0,104 y 0,243 mM de inhibidor. Este parámetro fue sustituido en la siguiente ecuación:

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

$$K_i' = \frac{0,035 \text{ mM}}{1,29 - 1} = 0,123 \text{ mM}$$

Luego de calcular el valor de K_i' para las tres concentraciones de inhibidor se obtuvo la media con un valor de $0,107 \pm 0,021$ mM, que representa la dosis necesaria para disminuir la actividad enzimática a la mitad (IC_{50}').

AVI.2. DETERMINACIÓN DEL IC_{50} DEL EXTRACTO SEMIPURIFICADO DE CHOCHO FRENTE A QUIMOTRIPSINA

Para determinar K_m y $V_{m\acute{a}x}$ se ensayó la actividad proteolítica de quimotripsina, sin inhibidor y con tres soluciones del extracto inhibidor de concentraciones finales en la mezcla de reacción 0,015; 0,031 y 0,046 mM; este procedimiento de desarrollo de acuerdo con el método descrito en el acápite 2.4.3.2.

En la Tabla AVI.3 se presenta la actividad proteolítica de quimotripsina sin el extracto inhibidor y con el extracto inhibidor semipurificado de chocho a tres concentraciones.

Tabla AVI.3. Actividad proteolítica de quimotripsina en presencia y ausencia del extracto semipurificado de chocho, a diferentes concentraciones de sustrato

Concentración de sustrato		Actividad proteolítica de papaína (U/mL)			
% (w/v)	mM	Sin inhibidor	Extracto inhibidor (mM)		
			0,015	0,031	0,046
0,5	0,042	43,80 ± 2,63 ^E	27,86 ± 1,52 ^E	19,33 ± 1,40 ^E	13,83 ± 1,03 ^E
1,0	0,085	70,36 ± 4,59 ^D	45,67 ± 2,41 ^D	34,05 ± 2,71 ^D	25,50 ± 2,31 ^D
1,5	0,127	86,32 ± 5,87 ^C	61,20 ± 5,43 ^C	47,96 ± 3,89 ^C	35,84 ± 2,34 ^C
2,0	0,169	95,54 ± 7,50 ^B	75,07 ± 2,87 ^B	54,67 ± 4,61 ^B	44,21 ± 1,45 ^B
2,5	0,212	107,90 ± 6,11 ^A	84,53 ± 6,71 ^A	68,67 ± 5,55 ^A	50,54 ± 3,57 ^A

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

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas

(Test de rangos múltiples, 95 % de confianza)

La actividad proteolítica de quimotripsina se incrementó con la concentración de caseína en ausencia y presencia del extracto inhibidor, el comportamiento que se observa es característico del modelo cinético de Michaelis-Menten. También se puede apreciar que las tres concentraciones de extracto inhibidor disminuyeron la actividad proteolítica de quimotripsina en todas las concentraciones de sustrato, además existen diferencias estadísticas significativas entre las actividades a la misma concentración de sustrato.

Para determinar los parámetros cinéticos K_m y $V_{m\acute{a}x}$ se calcularon los inversos de la concentración de sustrato y la actividad proteolítica de papaína, como se muestra en la Tabla AVI.4.

Tabla AVI.4. Valores inversos de la actividad proteolítica de quimotripsina en presencia y ausencia del extracto semipurificado de chocho a diferentes concentraciones de sustrato

1/Concentración de sustrato (mM ⁻¹)	1/Actividad proteolítica de quimotripsina (U/mL)			
	Sin inhibidor	Extracto inhibidor (mM)		
		0,015	0,031	0,046
23,81	0,0228	0,0359	0,0517	0,0723
11,76	0,0142	0,0219	0,0294	0,0392
7,87	0,0116	0,0163	0,0209	0,0279
5,92	0,0105	0,0133	0,0183	0,0226
4,72	0,0093	0,0118	0,0146	0,0198

La gráfica de estos valores de muestra en la Figura 3.13 de la sección 3.5.2.2 en la que se observa una tendencia lineal en los cuatro ensayos; este método fue establecido por Lineweaver-Burk para linealizar la ecuación de Michaelis-Menten.

Los parámetros K_m y $V_{m\acute{a}x}$ fueron calculados del mismo modo al que se ejemplifica para el extracto de fréjol en la sección anterior.

Para calcular la constante de inhibición (K_i), que para este estudio corresponderá más bien al valor de IC_{50} , es necesario primero determinar el valor de α , que es el factor que relaciona el valor de K_m calculada en ausencia de inhibidor con el valor de K_m en presencia del inhibidor o también denominada $K_{m\text{aparente}}$. A continuación se presenta un ejemplo se calculó para determinar el factor α correspondiente al ensayo con la menor concentración de inhibidor.

$K_{m\text{aparente}} = \alpha K_m$ (Nelson y Cox, 2009, p. 208).

$$\alpha = \frac{K_{m\text{aparente}}}{K_m}$$

$$\alpha = \frac{0,21}{0,11} = 1,83$$

Del mismo modo se calcularon los otros dos factores α para las concentraciones de 0,031 y 0,046 mM de inhibidor. Este parámetro fue sustituido en la siguiente ecuación:

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

$$K_i = \frac{0,015 \text{ mM}}{1,83 - 1} = 0,018 \text{ mM}$$

Luego de calcular el valor de K_i para las tres concentraciones de inhibidor se obtuvo la media con un valor de $0,018 \pm 0,0012$ mM, que representa la dosis necesaria para disminuir la actividad enzimática a la mitad (IC_{50}).

ANEXO VII

BALANCE DE ENERGÍA DE LA PLANTA PILOTO

Se determinó la cantidad de energía necesaria para elevar la temperatura en los procesos de precipitación de proteínas por tratamiento térmico y de concentración por evaporación; se usará vapor saturado como fluido calefactor. Y el cálculo se realizó mediante la Ecuación VII.1.

$$Q = m \times C_p \times \Delta T \quad [AVII.1]$$

Donde

- Q: Energía necesaria (kJ/d),
 m: Masa (kg/d),
 Cp: Calor específico (kJ/kg°C),
 ΔT: Variación de la temperatura (°C).

El Cp del extracto se determinó con los valores de Cp de sus componentes, asumiendo que se tiene solo proteína, de la siguiente manera:

Tabla AVII.1. Calor específico del extracto del fréjol

Componente	Cp (kJ/kg°C)
Agua	4,18
Proteína (7mg/mL)	2,17
Total	4,16

A continuación se detalla la cantidad de energía necesaria en cada proceso:

a) Precipitación de proteínas por tratamiento térmico



$$Q = m \times C_p \times \Delta T$$

$$Q = 22,55 \text{ kg} \times 4,16 \frac{\text{kJ}}{\text{kg} \times ^\circ\text{C}} \times (60-17) ^\circ\text{C}$$

$$Q = 4\,033,74 \text{ kJ}$$

b) Concentración por evaporación



$$Q = m \times C_p \times \Delta T$$

$$Q = 22,40 \text{ kg} \times 4,16 \frac{\text{kJ}}{\text{kg} \times ^\circ\text{C}} \times (55 - 17) ^\circ\text{C}$$

$$Q = 3540,99 \text{ kJ}$$

ANEXO VIII

HOJAS DE ESPECIFICACIONES TÉCNICAS DE LOS EQUIPOS

Tabla AVIII.1. Hoja de especificaciones técnicas del molino

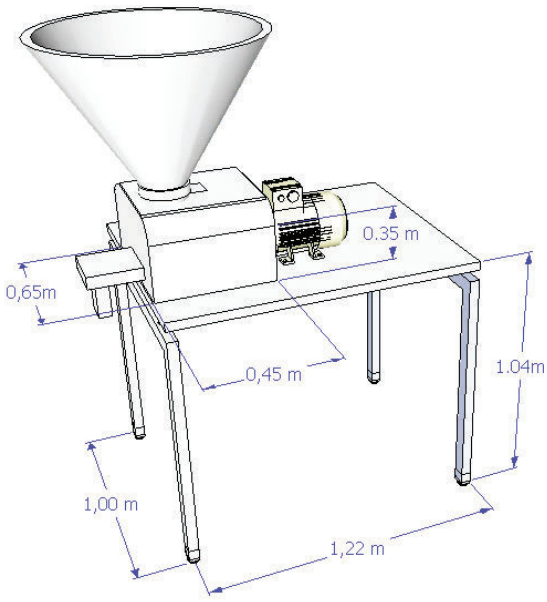
Modelo: Molino LYD-820	Código: MO-101	Fabricante: INCALFER
FUNCIÓN	Muele las semillas hasta un tamaño de partícula menor a 0,01 mm	
DATOS DE DISEÑO	Dimensiones: Largo: 0,45 m Ancho: 0,65 m Altura: 0,35 m	
	Condiciones de operación: - Voltaje : 220 v - Consumo de energía : 1,8 kWh - Velocidad de rotación : 1 420 rpm - Tamaño producto : Mallas 50~200 - Producción de salida : 20~40 kg/h - Peso neto : 40 kg	
Material de construcción	Acero inoxidable 316	
		

Tabla AVIII.2. Hoja de especificaciones técnicas de los tanques abiertos

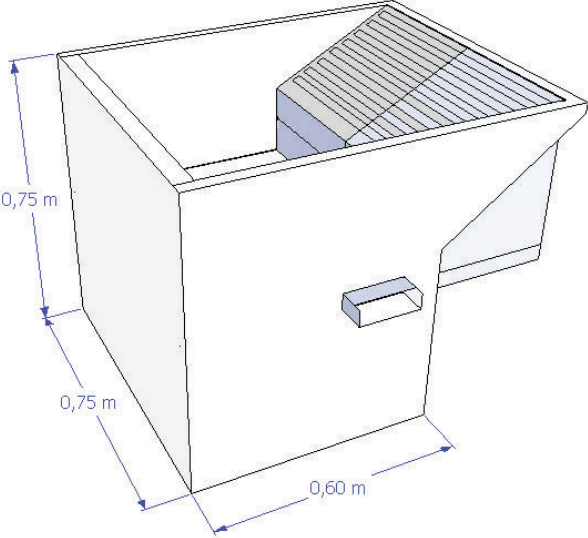
Modelo: Tanque auxiliar	Código: TT-102 TT-108	Fabricante: INOXIDABLES MT
FUNCIÓN	<ul style="list-style-type: none"> - TT-102 Recapta la harina, luego del proceso de molienda, y alimenta al elevador de cangilones para el desengrasado - TT-108 Recapta la harina desengrasada y alimenta al elevador de cangilones para la homogenización 	
DATOS DE DISEÑO	Dimensiones: Largo: 0,60 m Ancho: 0,75 m Altura: 0,75 m	
	Condiciones de operación: - Capacidad : 0,34 m ³	
Material de construcción	Acero inoxidable 304	
		

Tabla AVIII.3. Hoja de especificaciones técnicas de los elevadores de cangilones

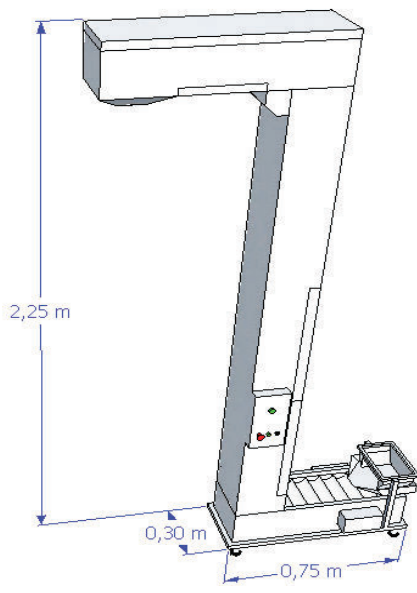
Modelo: Elevador 43CDI33	Código: EC-103 EC-109	Fabricante: INOXIDABLES MT
FUNCIÓN	<ul style="list-style-type: none"> - Transporta la harina desde el tanque abierto TA-102 hasta en tanque TA-104 para el desengrasado - Transporta la harina desengrasada desde el tanque abierto TT-108 hasta el tanque TA-110 para la homogenización 	
DATOS DE DISEÑO	Dimensiones: Largo: 0,75 m Ancho: 0,30 m Altura: 2,25 m	
	Condiciones de operación: <ul style="list-style-type: none"> - Voltaje : 220 v - Consumo de energía : 1,2 kWh - Velocidad de elevación : 0,5 m³/h - Peso neto : 75 kg 	
Material de construcción	Acero inoxidable 304	
 <p>El diagrama muestra un elevador de cangilones con un diseño vertical. Las dimensiones indicadas son: una altura total de 2,25 m desde la base hasta el nivel superior; un ancho de 0,30 m en la base; y un largo de 0,75 m en la base. El dispositivo incluye un depósito superior, un eje central con cangilones, un panel de control con botones y luces, y una base con ruedas para facilitar el movimiento.</p>		

Tabla AVIII.4. Hoja de especificaciones técnicas de los tanques con agitación

Modelo: Tanque cilíndrico vertical	Código: TA-104 TA-110	Fabricante: INOXIDABLES MT
FUNCIÓN	<ul style="list-style-type: none"> - TA-104 mezcla la harina con el solvente para el desengrasado - TA-110 mezcla la harina con el tampón fosfato para la homogenización 	
DATOS DE DISEÑO	Dimensiones: Diámetro: 0,65 m Altura: 0,35 m	
	Condiciones de operación: <ul style="list-style-type: none"> - Voltaje agitador : 220 v - Consumo de energía : 0,5 kWh - Velocidad de rotación : 300 rpm - Capacidad : 150 L - Peso neto : 120 kg 	
Material de construcción	Acero inoxidable 316	

Tabla AVIII.5. Hoja de especificaciones técnicas de los tanques de almacenamiento

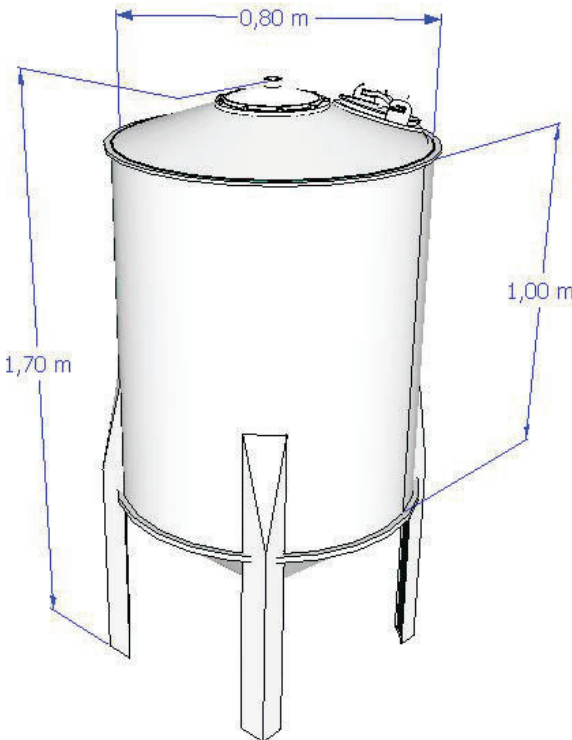
Modelo: Tanque de almacenamiento	Código: TC-105 TC-11	Fabricante: INOXIDABLES MT
FUNCIÓN	TC-105 Almacena 1- propanol para el desengrasado TC-111 Almacena tampón fosfato de sodio, 50 mM	
DATOS DE DISEÑO	Dimensiones: Diámetro: 0,80 m Altura: 1,00 m	
	Condiciones de operación: - Capacidad : 500 L - Peso neto : 60 kg	
Material de construcción	Acero inoxidable 316	
 <p>Diagrama de un tanque cilíndrico con dimensiones: diámetro 0,80 m, altura 1,00 m y altura total con patas 1,70 m.</p>		

Tabla AVIII.6. Hoja de especificaciones técnicas del recuperador de solventes

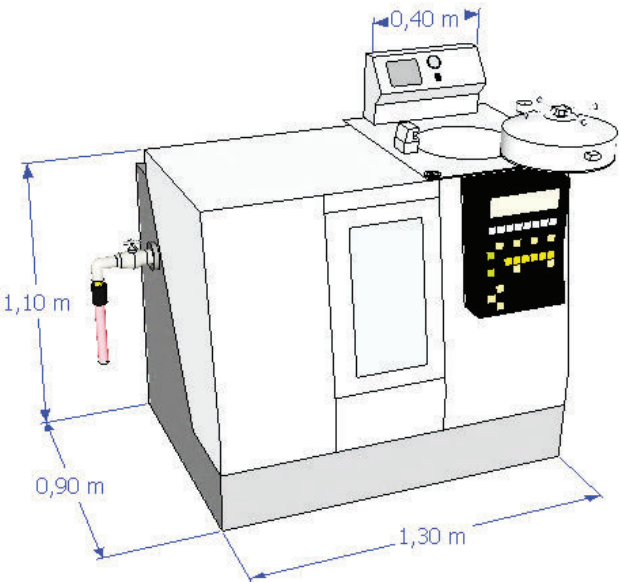
Modelo: FORS 25	Código: RS-106	Fabricante: MBP
FUNCIÓN	Es un sistema, que mediante destilación, recupera el 1-propanol contaminado que se obtiene del proceso de desengrasado	
DATOS DE DISEÑO	Dimensiones: Largo: 1,30 m Ancho: 0,90 m Altura: 1,10 m	
	Condiciones de operación: - Voltaje : 220 v - Consumo de energía : 2,0 kWh - Temperatura de ejercicio : 50 – 170 °C - Producción de salida : 20 L/h - Peso neto : 75 kg	
Material de construcción	Tanque de acero inoxidable 304	
 <p>El diagrama muestra un equipo industrial rectangular con un panel de control digital en la parte superior derecha. Se indican las siguientes dimensiones: la altura total del equipo es de 1,10 m; el ancho es de 0,90 m; la longitud es de 1,30 m; y una extensión superior (que contiene el panel de control y otros componentes) mide 0,40 m de ancho. El equipo tiene un tanque de acero inoxidable 304 y un sistema de destilación para recuperar solventes.</p>		

Tabla AVIII.7. Hoja de especificaciones técnicas del secador de bandejas

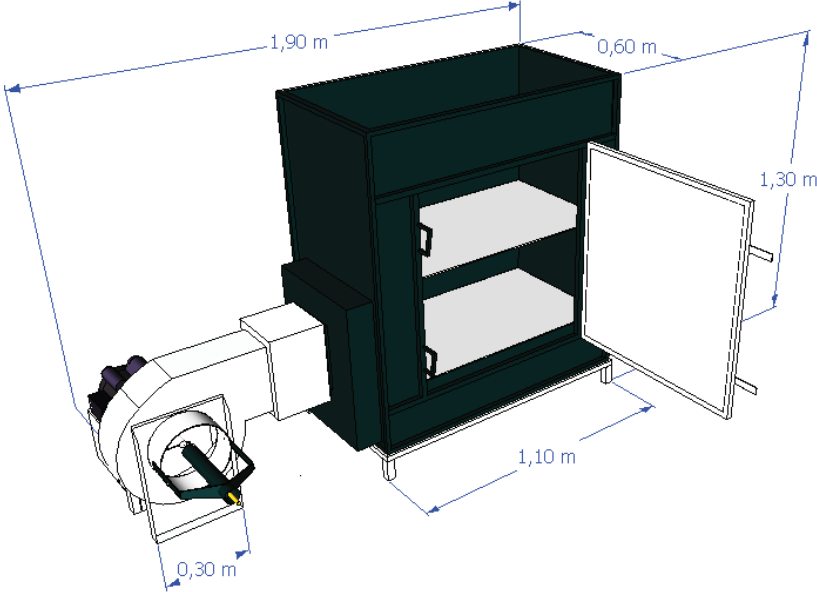
Modelo: Secador ISR-230	Código: SB-107	Fabricante: BREI
FUNCIÓN	Retira el 1-pronanol de la harina desengrasada	
DATOS DE DISEÑO	Dimensiones: Largo: 1,90 m Ancho: 0,60 m Altura: 1,30 m	
	Condiciones de operación: Voltaje : 220 Volt. Consumo de energía : 3 kWh Ventilador : 80 Wh. Temperatura : 0 a 100 °C. Capacidad : 20 Kg/h. Cantidad de Bandejas : 10 Unidades.	
Material de construcción	Acero inoxidable 304	
		

Tabla AVIII.8. Hoja de especificaciones técnicas de las centrífugas

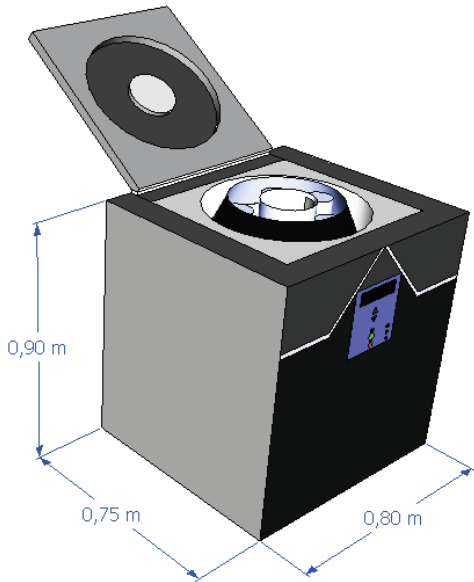
Modelo: S240-wer	Código: CC-112 CC-116	Fabricante: PIERALICI
FUNCIÓN	<ul style="list-style-type: none"> - Separa por centrifugación el extracto del material solido luego de la homogenización con el tampón - Separa por centrifugación el extracto del material solido luego del tratamiento térmico 	
DATOS DE DISEÑO	Dimensiones: Largo: 0,80 m Ancho: 0,75 m Altura: 0,90 m	
	Condiciones de operación: <ul style="list-style-type: none"> - Voltaje : 220 v - Consumo de energía : 2,5 kWh - Velocidad de rotación : 10 000 rpm - Capacidad : 12 L - Arreglo : 6 frascos de 2 L 	
Material de construcción	Acero inoxidable 304	
 <p>Diagrama de una centrífuga con sus dimensiones: altura 0,90 m, ancho 0,75 m y largo 0,80 m.</p>		

Tabla AVIII.9. Hoja de especificaciones técnicas de los sistemas de filtración tangencial

Modelo: 14058-0	Código: TF-113 TF-114	Fabricante: INCALFER
FUNCIÓN	<ul style="list-style-type: none"> - TF-113 Filtra el extracto a través de una membrana de 50 kDa - TF-114 Filtra el extracto a través de una membrana de 10 kDa 	
DATOS DE DISEÑO	Dimensiones: Largo: 2,00 m Ancho: 0,90 m Altura: 1,80 m	
	Condiciones de operación: <ul style="list-style-type: none"> - Voltaje : 220 v - Consumo de energía : 8 kWh - Área de la membrana : 0,347 m² - Producción de salida : 5 L/h 	
Material de construcción	Acero inoxidable 316	

Tabla AVIII.10. Hoja de especificaciones técnicas de la marmita

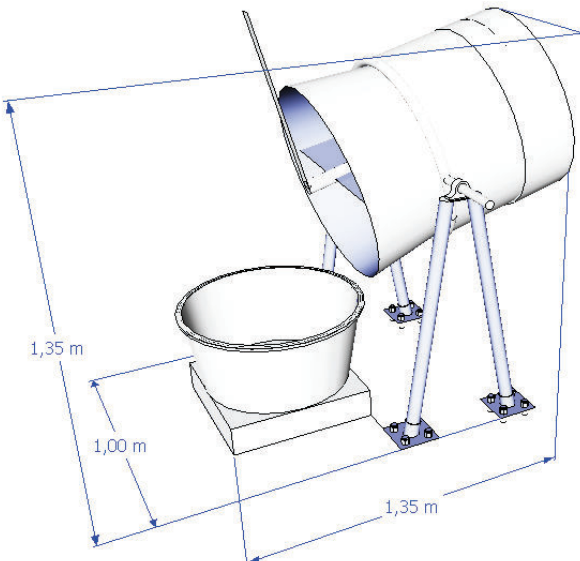
Modelo: Molino LYD-820	Código: MM-115	Fabricante: INOXIDABLE MT
FUNCIÓN	Calienta el extracto a 60 °C durante 30 min, para precipitar proteínas no deseables	
DATOS DE DISEÑO	Dimensiones: Largo: 1,00 m Ancho: 1,35 m Altura: 1,35 m	
	Condiciones de operación: - Consumo de energía : 0,4 kWh - Velocidad de rotación : 50 rpm - Capacidad : 50 L	
Material de construcción	Acero inoxidable 316	
 <p>El diagrama muestra una marmita cilíndrica con un soporte de tres patas y un recipiente inferior. Las dimensiones indicadas son: un ancho de 1,35 m, un largo de 1,00 m y una altura total de 1,35 m.</p>		

Tabla AVIII.11. Hoja de especificaciones técnicas del evaporador

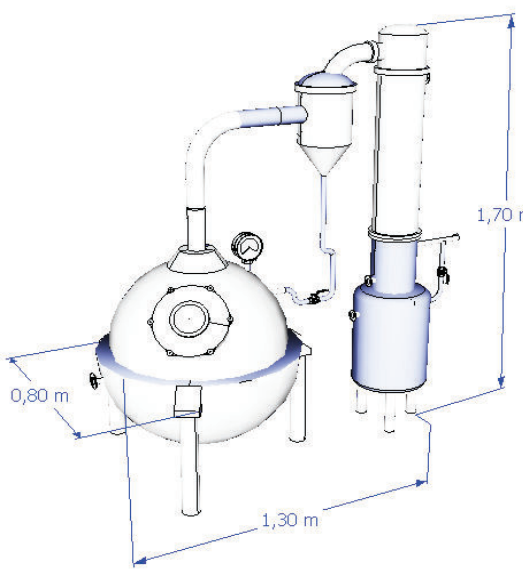
Modelo: Modelo L	Código: CE-117	Fabricante: MBP
FUNCIÓN	Concentra la muestra mediante evaporación, a presión parcial de vacío	
DATOS DE DISEÑO	Dimensiones: Largo: 1,30 m Ancho: 0,80 m Altura: 1,70 m	
	Condiciones de operación: <ul style="list-style-type: none"> - Voltaje : 220 v - Consumo de energía : 4 kWh - Marmita de fondo esférico con tapa abombada. - Chaqueta de vapor inferior para 3,5 kg/cm² de presión. - Agitador tipo ancla con raspadores de teflón. - Motorreductor de 1 HP - Columna de condensación. - Motobomba de vacío de 2 HP 	
Material de construcción	Acero inoxidable 304 – 316	
		

Tabla AVIII.12. Hoja de especificaciones técnicas de la envasadora

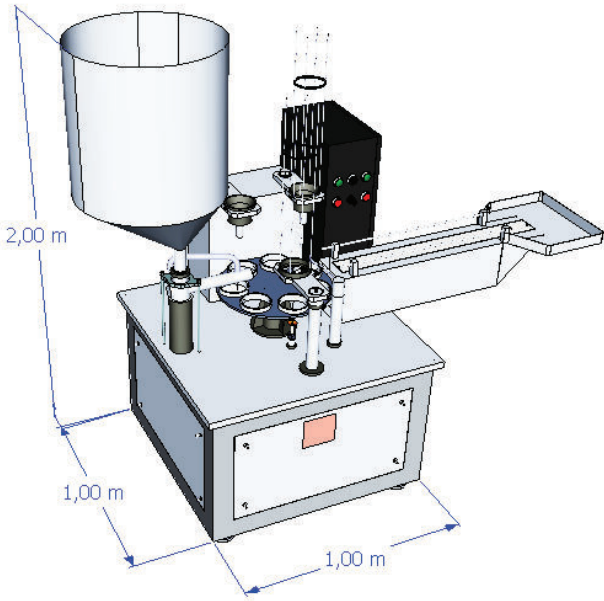
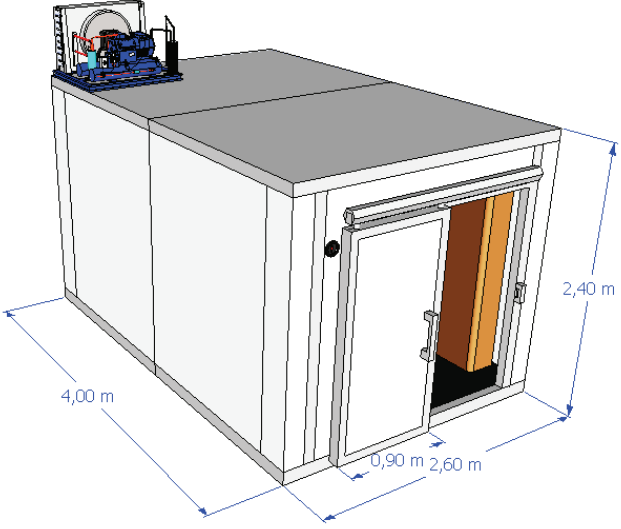
Modelo: RZJT-500	Código: EV-118	Fabricante: Rezpack
FUNCIÓN	Envasa el extracto semipurificado en botellas de vidrio ámbar	
DATOS DE DISEÑO	Dimensiones: Largo: 1,00 m Ancho: 1,00 m Altura: 2,00 m	
	Condiciones de operación: - Voltaje : 220 v - Consumo de energía : 0,7 kWh - Velocidad : 0-40 veces - Tamaño producto : botellas 100 -1000 mL - Precisión : $\pm 1 \%$	
Material de construcción	Acero inoxidable 316 - 304	
 <p>El diagrama muestra una envasadora industrial con un depósito superior cilíndrico, un mecanismo de llenado central y una bandeja de salida lateral. Las dimensiones indicadas son: altura total de 2,00 m, largo de 1,00 m y ancho de 1,00 m.</p>		

Tabla AVIII.13. Hoja de especificaciones técnicas de la cámara de congelación

Modelo: CRC-47TR	Código: CF-119	Fabricante: INCALFER
FUNCIÓN	Almacena el producto terminado a -20 °C	
DATOS DE DISEÑO	Dimensiones: Largo: 2,60 m Ancho: 4,00 m Altura: 2,40 m	
	Condiciones de operación: - Voltaje : 220 v - Consumo de energía : 3,5 kWh - Aislamiento : 80 mm - Temperatura : -40 a 4 °C - Capacidad : 20 m ³	
Material de construcción	Acero inoxidable 304	
 <p>El diagrama muestra una cámara de congelación rectangular con una puerta de apertura lateral. Las dimensiones indicadas son: un largo total de 4,00 m, una altura de 2,40 m y un ancho de 2,60 m. La puerta tiene un ancho de 0,90 m. En la parte superior de la cámara se encuentra el sistema de refrigeración, que incluye un compresor y tuberías.</p>		

ANEXO IX

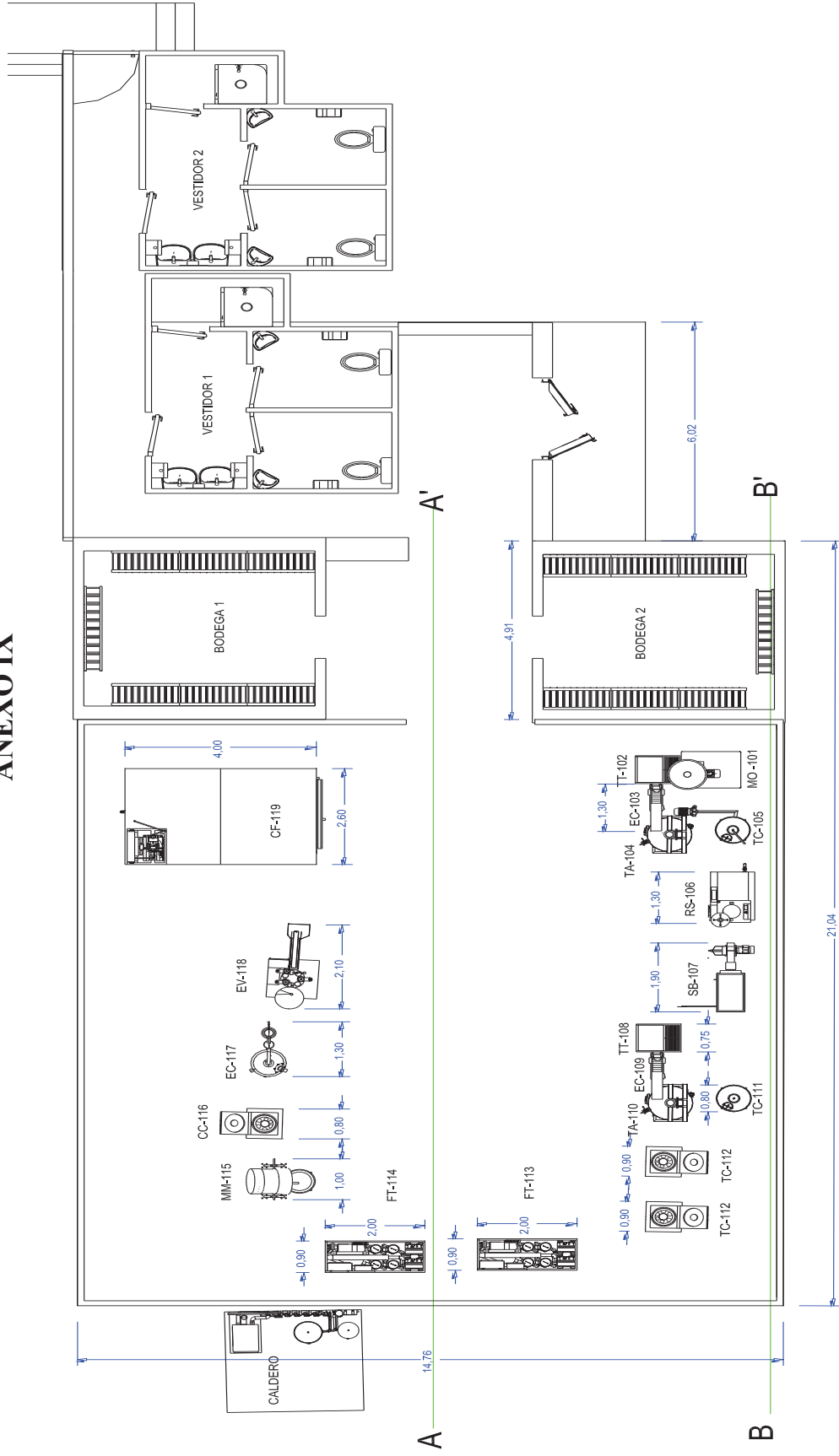


Figura AIX.1. Distribución del área de producción (LAY OUT)

ANEXO X

ELEVACIONES DEL ÁREA DE PRODUCCIÓN

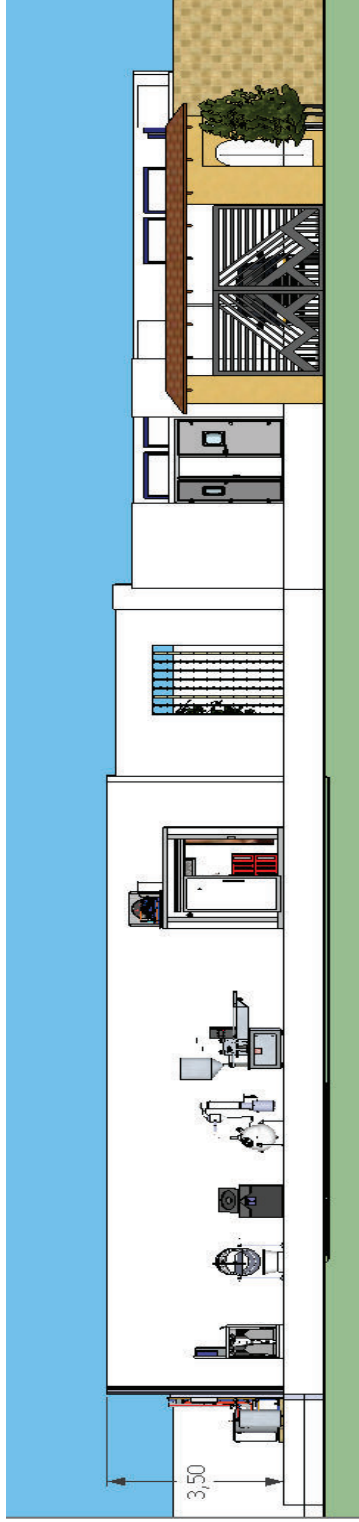


Figura AX.1. Elevación del área de producción, corte A-A'

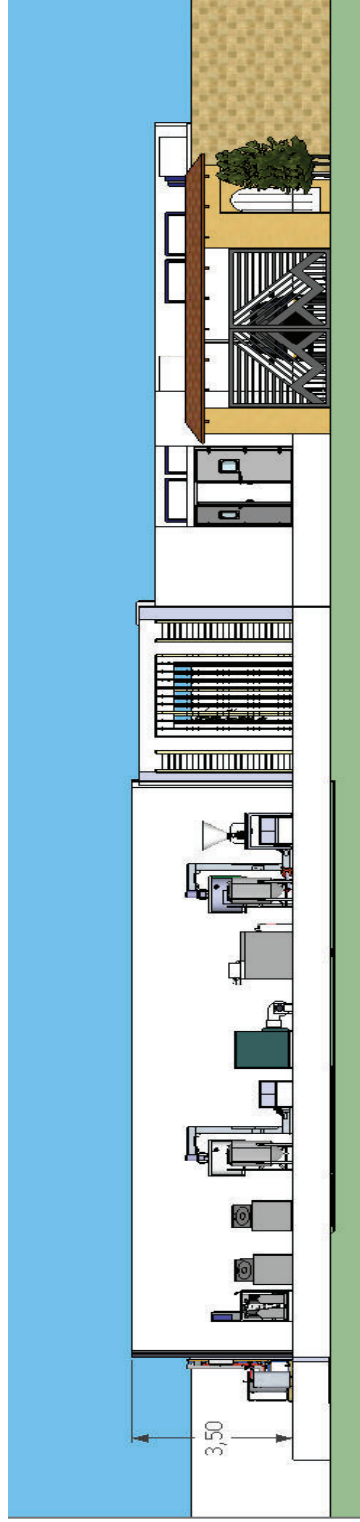
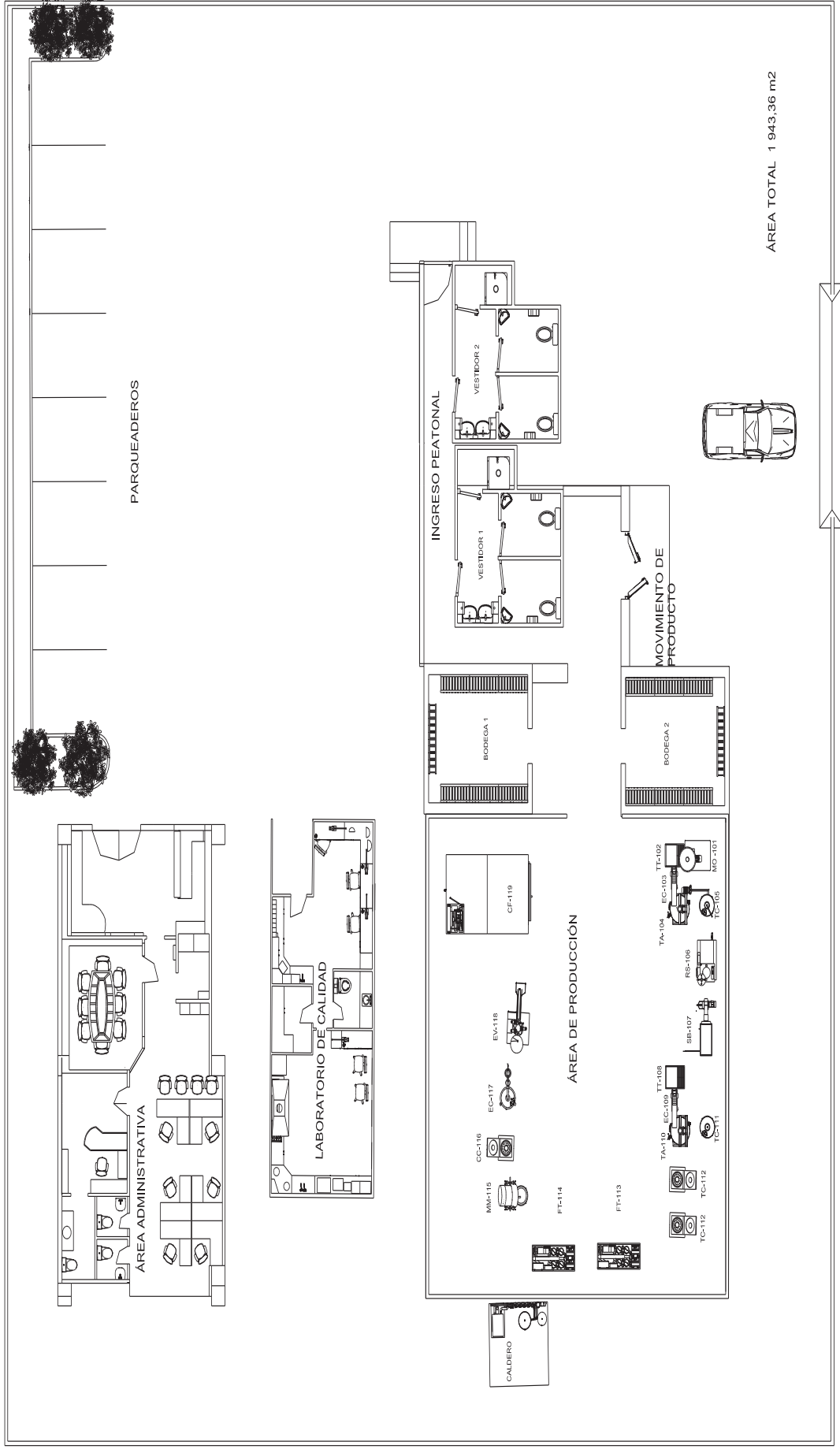


Figura AX.2. Elevación del área de producción, corte B-B'

ANEXO XI

DISTRIBUCIÓN DE LAS ÁREAS DE PRODUCCIÓN, LABORATORIO, SANITARIAS Y ADMINISTRATIVAS DE LA PLANTA PILOTO



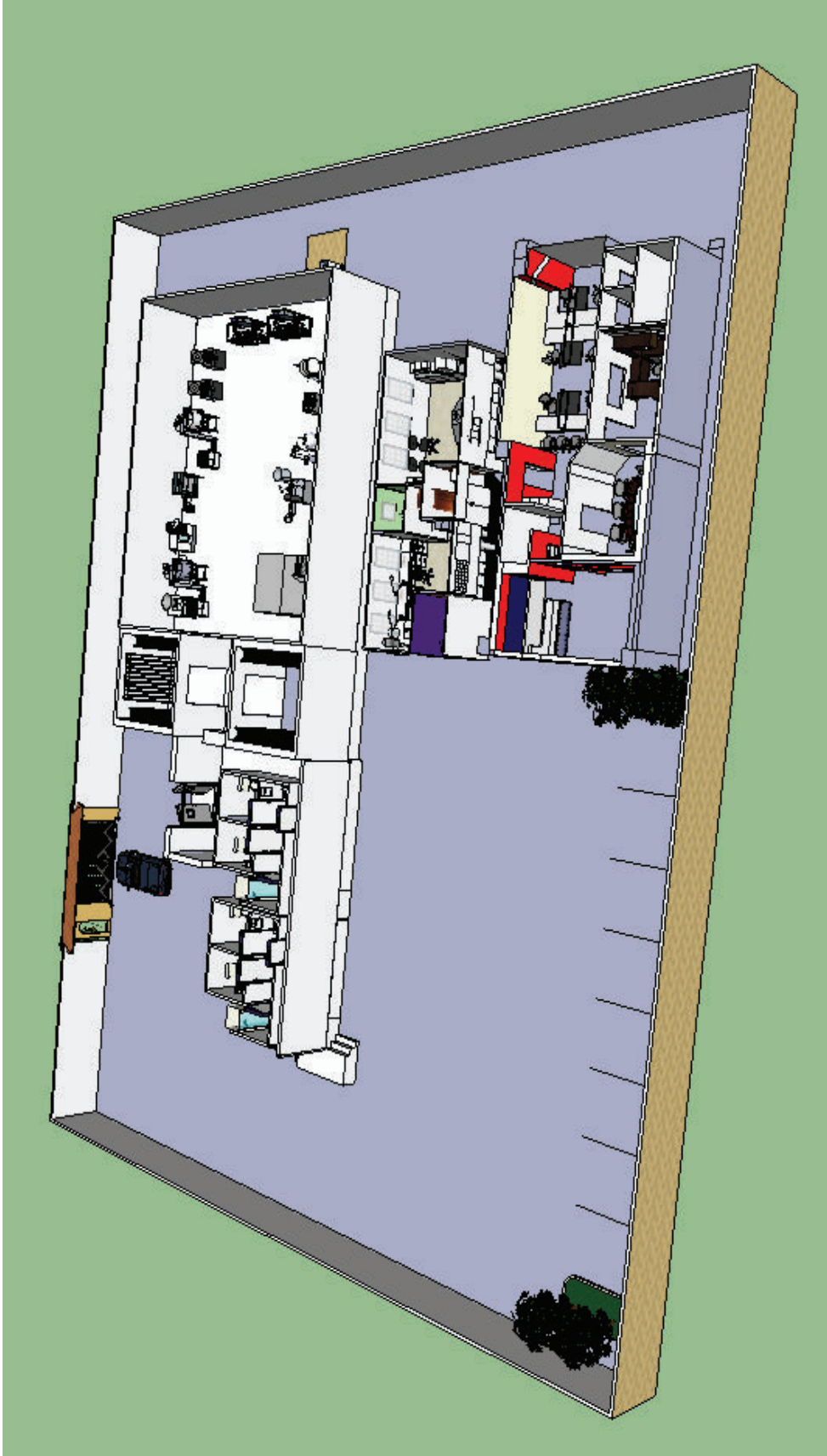


Figura AXI.1.1. Perspectiva 3D de la planta piloto

ANEXO XII

ESTIMACIÓN DEL COSTO DE PRODUCCIÓN DE 5L/d DE EXTRACTO SEMIPURIFICADO CON ACTIVIDAD INHIBIDORA DE PROTEASAS

XII.1. ACTIVOS FIJOS, ACTIVOS DIFERIDOS Y CAPITAL INICIAL

En la Tabla AXII.1 se detallan los activos fijos de la planta piloto

Tabla AXII.1. Activos fijos de la planta piloto

Rubros	Descripción	Cantidad	Costo individual (\$)	Costo total (\$)
Terreno	1 943,36 m ²	1	38 867,20	38 867,20
Construcción	632,34 m ²	1	126 468,00	126 468,00
Equipos	Molino	1	2 500,00	2 500,00
	Tanque abierto	2	800,00	1 600,00
	Elevador de cangilones	2	2 700,00	5 400,00
	Tanque con agitación	2	2 400,00	4 800,00
	Tanque de almacenamiento	2	1 350,00	2 700,00
	Recuperador de solventes	1	2 500,00	2 500,00
	Secador de bandejas	1	3 600,00	3 600,00
	Centrífuga	3	4 500,00	13 500,00
	Filtrador tangencial	2	8 700,00	17 400,00
	Marmita con agitación	1	3 200,00	3 200,00
	Concentrador por evaporación	1	5 500,00	5 500,00
	Envasadora	1	3 800,00	3 800,00
Cámara de congelación	1	17 000,00	17 000,00	
Instalación de equipos		1	25 000,00	25 000,00
Laboratorio		1	50 000,00	50 000,00
Equipamiento de oficinas		1	10 000,00	10 000,00
TOTAL				333 835,20

Los activos diferidos se consideran aquellos valores que incurren las empresas cuando inicia sus actividades, en el caso de la planta piloto se considera la planeación, ingeniería del proyecto, supervisión y administración, todos se ajustan a porcentajes recomendados. Así también se considera un valor inicial para el arranque de la planta, es decir un monto necesario para que se adquiera materia prima e insumos correspondientes para un primer lote. En la Tabla AXII.2 se presentan los activos diferidos y capital inicial.

Tabla AXII.2. Activos diferidos y capital inicial de la planta piloto

Parámetros		Valor (\$)
Activos diferidos	Planeación del proyecto (3 %)	10 051,06
	Ingeniería del proyecto (4 %)	13 353,41
	Supervisión (1,5 %)	5 007,57
	Administración (1 %)	3 338,35
Capital inicial		4 107,08
TOTAL		35 857,47

Los porcentajes recomendados corresponden a la inversión total de la planta piloto

XII.2. AMORTIZACIÓN DE LOS ACTIVOS FIJOS, ACTIVOS DIFERIDOS Y CAPITAL INICIAL DE LA PLANTA PILOTO

En la Tabla AXII.3 se detalla la amortización de los activos fijos para 10 años

Tabla AXII.3. Amortización de los activos fijos de la planta piloto, a 10 años

Rubros	Descripción	Costo total (\$)	Valor salva (%)	Amortización por lote
Terreno	1 943,36 m ²	38 867,20	90	1,94
Construcción	632,34 m ²	126 468,00	50	31,61
Equipos	Molino	2 500,00	10	1,12
	Tanque abierto	1 600,00	10	0,72
	Elevador de cangilones	5 400,00	10	2,43
	Tanque con agitación	4 800,00	10	2,16
	Tanque de almacenamiento	2 700,00	10	1,21
	Recuperador de solventes	2 500,00	10	1,12
	Secador de bandejas	3 600,00	10	1,62
	Centrífuga	13 500,00	10	6,07
	Filtrador tangencial	17 400,00	10	7,83
	Marmita con agitación	3 200,00	10	1,44
	Concentrador por evaporación	5 500,00	10	2,47
	Envasadora	3 800,00	10	1,71
	Cámara de congelación	17 000,00	10	7,65
Instalación de equipos		25 000,00	0	11,25
Laboratorio		50 000,00	20	20,00
Equipamiento de oficinas		10 000,00	10	4,50
TOTAL		333 835,20		106,89

En la Tabla AXII.4 se presenta la amortización de los activos diferidos y el capital inicial, para 10 años

Tabla AXII.4. Amortización de los activos diferidos y capital inicial de la planta piloto, a 10 años

Parámetros		Valor total (\$)	Valor salva (%)	Amortización por lote
Activos diferidos	Planeación del proyecto	10 051,06	0	5,03
	Ingeniería del proyecto	13 353,41	0	6,68
	Supervisión	5 007,57	0	2,50
	Administración	3 338,35	0	1,67
Capital inicial		4 107,08		2,05
TOTAL		35 857,47		17,93

La amortización por lote se calculó con la Ecuación AXII.1, de la siguiente manera

$$\text{Amortización por lote} = \frac{\text{valor total} \times (1 - \text{valor salva})}{\text{tiempo en años} \times \text{lotes al año}} \quad [\text{AXII.1}]$$

XII.3. CONSUMO DE ENERGÍA DE LOS EQUIPOS DE LA PLANTA PILOTO

El consumo de energía de los equipos se calculó de acuerdo con la potencia que especifica cada uno en las hojas técnicas del Anexo VIII y con el tiempo de operación. El costo se estableció con una tarifa promedio de 0,21 dólares el kWh. En la tabla AXII.5 se muestra el consumo de energía de los equipos.

Tabla AXII.5. Consumo energético de los equipos de la planta piloto

Descripción	Cantidad	Potencia (kW)	Tiempo de operación (h)	Costo total (\$)
Molino	1	1,8	0,50	0,19
Elevador de cangilones	2	2,4	0,50	0,25
Tanque con agitación	2	0,5	4,00	0,42
Recuperador de solventes	1	2,0	0,75	0,32
Secador de bandejas	1	3,8	2,00	1,60
Centrífuga	3	7,5	0,50	0,79
Filtrador tangencial	2	16	1,00	3,36
Marmita con agitación	1	0,4	0,50	0,04
Concentrador por evaporación	1	4,0	0,30	0,25
Envasadora	1	0,7	0,50	0,07
Cámara de congelación	1	3,5	24,00	17,64
TOTAL				24,93

XII.4. ESTRUCTURA ORGANIZACIONAL DE LA PLANTA PILOTO Y COSTO DE MANO DE OBRA

Para la operación de la planta piloto se estableció un esquema organizacional con un gerente general quien coordinará todo el trabajo con los jefes de producción y laboratorio, quienes, a su vez cuentan con dos operarios y dos analistas respectivamente. En la Figura AXII.1 se muestra el orden jerárquico propuesto.

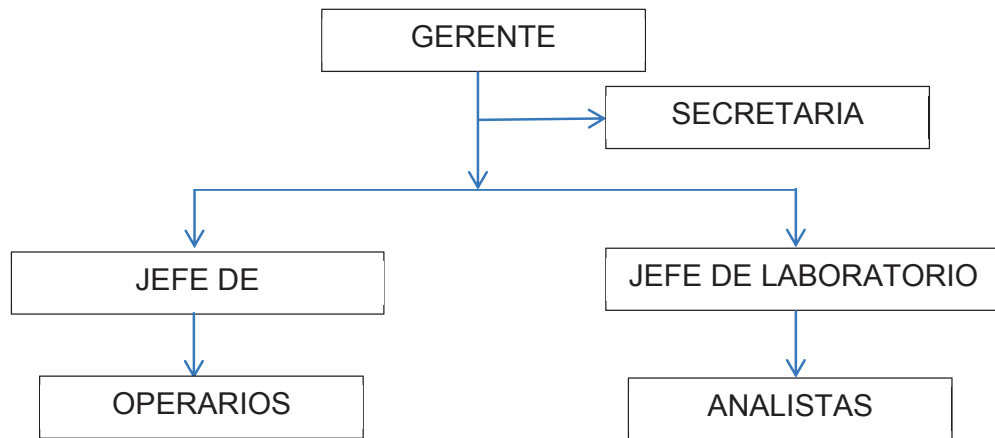


Figura AXII.1. Esquema organizacional de la planta piloto