

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AGROINDUSTRIA

AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN PARCIAL Y CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LAS PROTEASAS PRESENTES EN EL LÁTEX DE LOS FRUTOS DE UNA PLANTA DEL GÉNERO *Vasconcella*

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

MARCO VINICIO SINCHÉ SERRA

markeins314@hotmail.com

Director: ING. JUAN PATRICIO CASTILLO DOMÍNGUEZ, Ph.D.

pesd@yahoo.com

Quito, Junio 2009

© Escuela Politécnica Nacional 2 009
Reservados todos los derechos de reproducción

DECLARACIÓN

Yo, MARCO VINICIO SINCHE SERRA, 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 vigente

Marco Vinicio Sinche Serra

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Marco Vinicio Sinche Serra bajo mi supervisión

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

La presente investigación contó con el auspicio financiero del proyecto PIC – 111 “Búsqueda de proteasas e inhibidores de proteasas vegetales con aplicaciones industriales y biomédicas (ETAPA I)” de SENACYT, que se ejecuta en el Departamento de Ciencias Nucleares, Laboratorio de Investigaciones Aplicadas

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
GLOSARIO	i
RESUMEN	v
INTRODUCCIÓN	vi
1. PARTE TEÓRICA	1
1.1. Plantas del género <i>Vasconcella</i>	1
1.1.1. Taxonomía.....	1
1.1.2. Morfología general	2
1.1.3. Propagación y ciclo de cultivo.....	3
1.1.4. Distribución y presencia del género <i>Vasconcella</i> en el ecuador	4
1.1.5. Importancia económica.....	7
1.1.6. Usos potenciales	7
1.2. Descripción y caracterización del látex de las plantas del género <i>Vasconcella</i>	9
1.2.1. Descripción del látex de las plantas del género <i>Vasconcella</i>	9
1.2.2. Caracterización del látex de plantas del género <i>Vasconcella</i>	10
1.2.3. El látex de <i>Carica papaya</i>	11
1.3. Proteasas presentes en el látex de algunas especies vegetales.....	12
1.3.1. Generalidades de las enzimas	12
1.3.1.1. Definición	12
1.3.1.2. Propiedades	12
1.3.2. Proteasas	13
1.3.2.1. Descripción.....	13
1.3.2.2. Clasificación.....	13
1.3.2.3. Cisteíno proteinasas.....	14
1.3.2.4. Actividad proteolítica en plantas del género <i>Vasconcella</i>	18
1.4. Aislamiento, purificación y caracterización de enzimas proteolíticas	19
1.4.1. Selección de la fuente	19
1.4.2. Acondicionamiento del látex	20

1.4.3. Purificación de las enzimas	21
1.4.3.1. Precipitación con solventes orgánicos	22
1.4.3.2. Cromatografía de filtración en gel.....	22
1.4.3.3. Cromatografía de intercambio iónico	24
1.4.4. Determinación espectrofotométrica de la concentración de proteína en los extractos obtenidos	25
1.4.5. Medición espectrofotométrica de la actividad enzimática	27
1.4.5.1. Unidades enzimáticas.....	27
1.4.5.2. Ensayos espectrofotométricos.....	28
1.4.6. Evaluación de los procesos de purificación de los extractos enzimáticos.....	29
1.4.7. Caracterización cinética de las enzimas	30
1.4.7.1. Cinética de Michaelis y Menten	31
1.4.7.2. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática.....	34
1.4.7.3. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática	34
1.4.7.4. Efecto del pH sobre la actividad enzimática.....	35
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	37
2.1. Materiales, reactivos y equipos	37
2.1.1. Materiales	37
2.1.2. Reactivos	37
2.1.3. Equipos	38
2.2. Métodos	38
2.2.1. Pruebas preliminares con látex de frutos de babaco (<i>Vasconcella</i> × <i>heilbornii</i> var. babaco) y de chamburo (<i>Vasconcella cundinamarcensis</i>)	38
2.2.2. Selección de tres especies representativas del género <i>Vasconcella</i>	39
2.2.3. Recolección y tratamiento de los frutos	40
2.2.4. Obtención y secado del látex	40
2.2.5. Preparación de extractos acuosos a partir del látex seco	41
2.2.6. Determinación espectrofotométrica de la concentración de proteína en los extractos obtenidos	42

2.2.7. Determinación de la actividad enzimática en los extractos obtenidos	43
2.2.7.1. Determinación de la actividad caseinolítica	43
2.2.7.2. Determinación de la actividad esterásica.....	46
2.2.7.3. Determinación de la actividad proteolítica con BApNA.....	48
2.2.7.4. Cálculo de la actividad enzimática específica	50
2.2.8. Precipitación de las proteínas presentes en los extractos acuosos.....	51
2.2.9. Purificación del extracto más activo por cromatografía de filtración en gel	52
2.2.10. Purificación del lote de fracciones más activas por cromatografía de intercambio iónico	54
2.2.10.1. Preparación de la columna de intercambio iónico	54
2.2.10.2. Alimentación de la muestra.....	54
2.2.10.3. Elución de la proteína fijada al soporte	55
2.2.11. Evaluación de los procesos de purificación.....	56
2.2.12. Determinación de los efectos del pH, la temperatura y la concentración de sustrato sobre la actividad proteolítica en la fracción más activa	56
2.2.12.1. Determinación del efecto del ph sobre la actividad proteolítica	56
2.2.12.2. Determinación del efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica.....	57
2.2.12.3. Determinación del efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad proteolítica.....	57
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
3.1. Métodos pruebas preliminares para la obtención y el secado del látex de frutos de plantas del género <i>Vasconcella</i>	59
3.1.1. Obtención del látex	59
3.1.2. Secado del látex	60
3.1.3. Estabilidad del látex seco almacenado en refrigeración	62
3.2. Extractos acuosos preparados a partir de látex de chamburo (<i>V. cundinamarcensis</i>), col de monte (<i>V. monoica</i>) y toronche (<i>V. stipulata</i>).....	63
3.2.1. Preparación de los extractos acuosos.....	63

3.2.2. Concentración de proteína y actividad proteolítica en los extractos acuosos	64
3.3. Evaluación de la purificación primaria de los extractos acuosos	66
3.3.1. Purificación primaria del extracto acuoso de látex de chamburo (<i>V. cundinamarcensis</i>)	67
3.3.2. Purificación primaria del extracto acuoso de látex de col de monte (<i>V. monoica</i>)	68
3.3.3. Purificación primaria del extracto acuoso de látex de toronche (<i>V. stipulata</i>)	69
3.4. Selección del extracto semipurificado más activo.....	70
3.5. Purificación cromatográfica del extracto semipurificado de toronche (<i>V. stipulata</i>), con respecto a las actividades caseinolítica y esterásica	72
3.5.1. Purificación cromatográfica por filtración en gel.....	72
3.5.2. Purificación cromatográfica por intercambio iónico	78
3.6. Purificación cromatográfica del extracto semipurificado de látex de toronche (<i>Vasconcella stipulata</i>), con respecto a la actividad proteolítica	86
3.6.1. Purificación cromatográfica por filtración en gel, con respecto a la actividad proteolítica	86
3.6.2. Purificación cromatográfica por intercambio iónico, con respecto a la actividad proteolítica	91
3.7. Caracterización cinética de la fracción más activa de látex de toronche (<i>V. stipulata</i>), purificada por cromatografía de intercambio iónico	96
3.7.1. Efecto del ph.....	96
3.7.2. Efecto de la temperatura	98
3.7.3. Efecto de la concentración del sustrato. cálculo de K_m y $V_{m\acute{a}x}$	100
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	104
4.1. Conclusiones.....	104
4.2. Recomendaciones	106
BIBLIOGRAFÍA	107
ANEXOS.....	116

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1.1. Clasificación taxonómica del género <i>Vasconcella</i>	1
Tabla 1.2. Especies del género <i>Vasconcella</i> presentes en el Ecuador	6
Tabla 1.3. Contenido porcentual de humedad, proteínas, lípidos y carbohidratos del látex de babaco (<i>V. × heilbornii</i> var. babaco)	10
Tabla 1.4. Actividad proteolítica de algunas especies del género <i>Vasconcella</i>	18
Tabla 2.1. Condiciones de operación del detector, el colector de fracciones y el registrador para la cromatografía de filtración en gel.....	53
Tabla 2.2. Condiciones de operación del detector, el colector de fracciones y el registrador para la cromatografía de intercambio iónico.....	55
Tabla 3.1. Concentración proteica, actividades caseinolítica y caseinolítica específica en extractos acuosos de látex fluido y látex coagulado, de frutos de babaco (<i>V. × heilbornii</i> babaco) y de chamburo (<i>V. cundinamarcensis</i>)	59
Tabla 3.2. Concentración proteica, actividades caseinolítica y caseinolítica específica en extractos acuosos de látex de frutos de babaco (<i>V. × heilbornii</i> babaco) y chamburo (<i>V. cundinamarcensis</i>), a diferentes temperaturas de secado	61
Tabla 3.3. Concentración proteica, actividades caseinolítica y caseinolítica específica en extractos acuosos de látex de frutos de babaco (<i>V. × heilbornii</i> var. babaco) y de chamburo (<i>V. cundinamarcensis</i>), preparados con 3 semanas de diferencia.....	62
Tabla 3.4. Látex fluido y látex seco obtenidos de frutos de babaco (<i>V. × heilbornii</i> var. babaco), chamburo (<i>V. cundinamarcensis</i>), col de monte (<i>V. monoica</i>) y toronche (<i>V. stipulata</i>).....	64
Tabla 3.5. Concentración proteica, actividades caseinolítica, esterásica y proteolítica en los extractos acuosos de látex de frutos de babaco (<i>V. × eilbornii</i> var. babaco), chamburo (<i>V. cundinamarcensis</i>), col de monte (<i>V. monoica</i>) y toronche (<i>V. stipulata</i>)	65
Tabla 3.6. Concentración proteica de los extractos semipurificados de látex de chamburo (<i>V. cundinamarcensis</i>), toronche (<i>V. stipulata</i>) y col de monte (<i>V. monoica</i>), resuspendidos en diferentes volúmenes de tampón fosfato 50 mM y pH 7,5	66
Tabla 3.7. Actividades caseinolítica, esterásica y proteolítica en el extracto semipurificado de látex de chamburo (<i>V. cundinamarcensis</i>)	67
Tabla 3.8. Rendimiento en proteína y en actividades caseinolítica, esterásica y proteolítica y grado de purificación en el extracto semipurificado de látex de chamburo (<i>V.cundinamarcensis</i>)	67

Tabla 3.9.	Actividades caseinolítica, esterásica y proteolítica en el extracto semipurificado de látex de col de monte (<i>V.monoica</i>)	68
Tabla 3.10.	Rendimiento en proteína y en actividades caseinolítica, esterásica y proteolítica y grado de purificación en el extracto semipurificado de látex de col de monte (<i>V. monoica</i>)	68
Tabla 3.11.	Actividades caseinolítica, esterásica y proteolítica en el extracto semipurificado de látex de toronche (<i>V.stipulata</i>).....	69
Tabla 3.12.	Rendimiento en proteína y en actividades caseinolítica, esterásica y proteolítica y grado de purificación en el extracto semipurificado de látex de toronche (<i>V.stipulata</i>)	69
Tabla 3.13.	Contenido de proteína y unidades de actividad caseinolítica y de actividad esterásica en el extracto semipurificado de látex de toronche (<i>V. stipulata</i>).....	72
Tabla 3.14.	Concentración de proteína y actividades caseinolítica y esterásica en las fracciones recolectadas de la cromatografía de filtración en gel del extracto semipurificado de látex de toronche (<i>V.stipulata</i>).....	73
Tabla 3.15.	Actividades caseinolítica específica y esterásica específica en las fracciones recolectadas de la cromatografía de filtración en gel del extracto semipurificado de látex de toronche (<i>V.stipulata</i>).....	75
Tabla 3.16.	Rendimientos en proteína, en actividad caseinolítica y en actividad esterásica y grado de purificación en las fracciones recolectadas de la cromatografía de filtración en gel del extracto semipurificado de látex de toronche (<i>V.stipulata</i>)	77
Tabla 3.17.	Contenido de proteína y unidades de actividad caseinolítica y de actividad esterásica en el extracto de látex de toronche (<i>V. stipulata</i>) purificado por cromatografía de filtración en gel.....	78
Tabla 3.18.	Concentración de proteína y actividades caseinolítica y esterásica en las fracciones recolectadas de la cromatografía de intercambio iónico, con el extracto de látex de toronche (<i>V.stipulata</i>) purificado por filtración en gel	79
Tabla 3.19.	Actividades caseinolítica específica y esterásica específica en las fracciones recolectadas de la cromatografía de intercambio iónico del extracto de látex de toronche (<i>V.stipulata</i>) purificado por filtración en gel	82
Tabla 3.20.	Rendimientos en proteína, en actividad caseinolítica y en actividad esterásica y grado de purificación en las fracciones recolectadas de la cromatografía de intercambio iónico del extracto de látex de toronche (<i>V.stipulata</i>) purificado por filtración en gel.....	85
Tabla 3.21.	Concentración de proteína y actividades proteolítica y proteolítica específica en las fracciones recolectadas de la cromatografía de filtración en gel del extracto semipurificado de látex de toronche (<i>V.stipulata</i>).....	87
Tabla 3.22.	Contenido de proteína y unidades de actividad proteolítica en el extracto semipurificado de látex de toronche (<i>V. stipulata</i>).....	89

Tabla 3.23.	Rendimientos en cantidad de proteína y en actividad proteolítica y grado de purificación de las fracciones resultantes de la cromatografía de filtración en gel del extracto semipurificado de látex de toronche (<i>V. stipulata</i>).....	90
Tabla 3.24.	Concentración de proteína y actividades proteolítica y proteolítica específica en las fracciones recolectadas de la cromatografía de intercambio iónico del extracto de látex de toronche (<i>V.stipulata</i>) purificado por filtración en gel.....	91
Tabla 3.25.	Contenido de proteína y unidades de actividad proteolítica en el extracto de látex de toronche (<i>V. stipulata</i>) purificado por cromatografía de filtración en gel.....	94
Tabla 3.26.	Rendimientos en cantidad de proteína y en actividad proteolítica y grado de purificación en las fracciones recolectadas de la cromatografía de intercambio iónico del extracto de látex de toronche (<i>V. stipulata</i>) purificado por filtración en gel.....	95
Tabla 3.27.	Actividad proteolítica con BApNA de la fracción más activa de látex de toronche (<i>V. stipulata</i>), purificada por intercambio iónico, a diferentes valores de pH.....	97
Tabla 3.28.	Actividad proteolítica con BApNA de la fracción más activa de látex de toronche (<i>V. stipulata</i>), purificada por intercambio iónico, a diferentes temperaturas.....	98
Tabla 3.29.	Actividad proteolítica con BApNA de la fracción más activa de látex de toronche (<i>V. stipulata</i>), purificada por intercambio iónico, a diferentes concentraciones de sustrato	100
Tabla 3.30.	Resumen de los parámetros de concentración proteica y de actividad proteolítica en BApNA, obtenidos en el proceso de purificación del extracto acuoso de látex de toronche (<i>Vasconcella stipulata</i>).....	103

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1. Hojas, tallos y frutos en una planta de babaco (<i>Vasconcella x heilbornii</i> var. babaco).....	3
Figura 1.2. Frutos de algunas plantas del género <i>Vasconcella</i> , recolectados en la provincia de Loja, Ecuador.....	5
Figura 1.3. Mermelada de chamburo “La Carlita” elaborada por el grupo El Salinerito en la provincia de Bolívar, Ecuador.....	8
Figura 1.5. Esquema de la cromatografía de filtración en gel	23
Figura 1.6. Esquema de la cromatografía de intercambio iónico.....	25
Figura 1.7. Esquema de la reacción de hidrólisis de BApNA, catalizada por papaína.....	29
Figura 1.8. Esquema de la curva hiperbólica cuadrática correspondiente al modelo de Michaelis - Menten	32
Figura 1.9. Esquema de la gráfica correspondiente al Modelo de Lineweaver-Burk para determinar K_M y $V_{m\acute{a}x}$	33
Figura 1.10. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática	35
Figura 1.11. Esquema del efecto del pH sobre la actividad enzimática.....	36
Figura 2.1. Diagrama del proceso para la obtención de látex seco en plantas del género <i>Vasconcella</i>	41
Figura 2.2. Diagrama del proceso para la preparación de extractos acuosos a partir de polvo de látex	42
Figura 2.3. Diagrama de procesos para la determinación de la actividad caseinolítica de los blancos.....	44
Figura 2.4. Diagrama de procesos para la determinación de la actividad caseinolítica de los extractos acuosos.....	45
Figura 2.5. Diagrama de procesos para la determinación de la actividad esterásica de los extractos acuosos.....	46
Figura 2.6. Diagrama de procesos para la determinación de la actividad esterásica de los blancos	47
Figura 2.7. Diagrama de procesos para la determinación de la actividad proteolítica con BApNA de los extractos acuosos	49
Figura 2.8. Diagrama de procesos para la preparación de la muestra en la determinación de la actividad proteolítica con BApNA.....	49
Figura 2.9. Diagrama del proceso de precipitación y resuspensión de proteínas a partir del extracto acuoso.....	52

Figura 3.1.	Actividades caseinolítica específica y esterásica específica en los extractos semipurificados de látex de chamburo (<i>V. cundinamarcensis</i>), toronche (<i>V. stipulata</i>) y col de monte (<i>V. monoica</i>).....	71
Figura 3.2.	Concentración proteica, actividades caseinolítica y esterásica contra número de fracción recolectada de la cromatografía de filtración en gel del extracto semipurificado preparado a partir de látex de toronche (<i>V. stipulata</i>).....	74
Figura 3.3.	Actividades caseinolítica específica y esterásica específica contra número de fracción recolectada de la cromatografía de filtración en gel del extracto semipurificado, preparado a partir de látex de toronche (<i>V. stipulata</i>).....	76
Figura 3.4.	Concentración proteica, actividades caseinolítica y esterásica contra número de fracción recolectada de la cromatografía de intercambio iónico del extracto de látex de toronche (<i>V. stipulata</i>) purificado por filtración en gel.....	80
Figura 3.5.	Actividades caseinolítica específica y esterásica específica contra número de fracción recolectada, para la cromatografía de intercambio iónico del extracto de látex de toronche (<i>V. stipulata</i>) purificado por filtración en gel.....	83
Figura 3.6.	Concentración de proteína, actividades proteolítica y proteolítica específicas contra número de fracción recolectada de la cromatografía de filtración en gel del extracto semipurificado de látex de toronche (<i>V. stipulata</i>).....	88
Figura 3.7.	Concentración de proteína, actividades proteolítica y proteolítica específica contra número de fracción recolectada de la cromatografía de intercambio iónico del extracto de látex de toronche (<i>V. stipulata</i>) purificado por filtración en gel.....	93
Figura 3.8.	Actividad proteolítica con BApNA contra pH, en la fracción más activa de l extracto de látex de toronche (<i>V. stipulata</i>), purificada por intercambio iónico.....	97
Figura 3.9.	Actividad proteolítica con BApNA contra temperatura, en la fracción más activa de látex de toronche (<i>V. stipulata</i>), purificada por intercambio iónico.....	99
Figura 3.10.	Actividad proteolítica con BApNA contra concentración de sustrato de la fracción más activa de látex de toronche (<i>V. stipulata</i>), purificada por intercambio iónico.....	101

INDICE DE ANEXOS

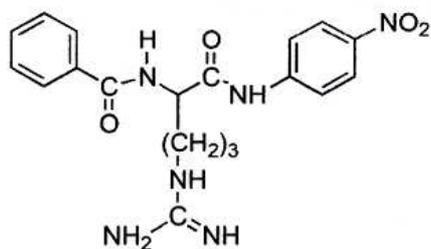
	Página
ANEXO A	
Fotografías de las plantas del género <i>Vasconcella</i> de las que se recolectaron los frutos.....	114
ANEXO B	
Significancia de la diferencia entre los valores de actividad proteolítica obtenidos para las dos temperaturas de secado de látex utilizadas.....	1177
ANEXO C	
Significancia de la diferencia entre los valores obtenidos para la actividad proteolítica en látex fluido y en látex coagulado.....	11919
ANEXO D	
Ejemplos de cálculo para la determinación de concentración proteica, actividad caseinolítica, actividad esterásica, actividad proteolítica con BApNA y actividad específica.....	1211
ANEXO E	
Ejemplos de cálculo para la determinación del grado de purificación y los rendimientos en proteína y en actividad, de un proceso de purificación.....	1244
ANEXO F	
Cromatogramas obtenidos para los extractos de toronche (<i>Vasconcella stipulata</i>).....	1266
ANEXO G	
Valores de las mediciones realizadas para determinar la concentración proteica, las actividades caseinolítica, esterásica y proteolítica con BApNA de los extractos y fracciones obtenidos en el estudio	1268

GLOSARIO

Actividad proteolítica: Es una medida del nivel de actividad que tiene una proteasa o enzima proteolítica. Expresa la cantidad de un sustrato convertido en producto, por unidad de tiempo. Su valor es determinado experimentalmente, bajo condiciones que se deben especificar.

AFLP: El polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP por sus siglas en inglés) es una técnica que, mediante el uso de enzimas de restricción, oligonucleótidos y una amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa), genera marcadores moleculares específicos. Estos marcadores moleculares permiten evidenciar variaciones o polimorfismos en la secuencia del ADN entre dos individuos, aunque éstas no modifiquen su fenotipo. Por este motivo, son herramientas de comprobación de estudios taxonómicos basados en características morfológicas.

BApNA: El hidrocloreuro de N- α -benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida es un sustrato cromogénico que permite la medición directa de la actividad hidrolasa peptídica, por colorimetría. El producto que se libera, se denomina p-nitroanilina. Su estructura química es la siguiente:



Baya: Es el tipo más común de fruto carnoso simple, en el cual la pared entera del ovario madura, generalmente, en forma de un pericarpio

comestible. Ejemplos de bayas son la uva, el tomate, el aguacate, la berenjena, la guayaba, y el pimiento.

Coagulación de una proteína: Es un proceso irreversible que se debe a la desnaturalización de las proteínas. Debido al gran tamaño de sus moléculas, las proteínas forman soluciones coloidales en medios líquidos. Cuando la influencia de un agente desnaturalizante provoca un cambio en la estructura terciaria o cuaternaria de las proteínas, éstas pueden precipitar en forma de coágulos.

Desnaturalización de una proteína: Es un cambio estructural de las proteínas, por el cual pierden su conformación espacial nativa y, de esta forma, su óptimo funcionamiento y en ocasiones sus propiedades físico-químicas también se ven alteradas. Entre las principales causas de la desnaturalización de una proteína se encuentran los cambios de pH, los cambios de temperatura y la adición de solventes o soluciones salinas.

Epitelio: Es un tejido de recubrimiento, formado por una fina capa de células que generalmente tienen una función secretora.

Esquejes: Es una porción del tallo o un brote de una planta que se emplea para injertarlo en otra o para plantarlo en el suelo, con el fin de que produzca raíces y dé origen a una nueva planta.

Estípula: Es cada uno de los dos apéndices, generalmente foliáceos, que aparecen en ambos lados de la base de las hojas de muchas especies vegetales.

Frutos partenocárpicos: Son frutos sin semillas en su interior, obtenidos sin fecundación, por desarrollo del óvulo. Se producen esporádicamente de manera natural o, artificialmente por aplicación de fitohormonas.

Lóculo: Es cada una de las cavidades que, separadas por tabiques longitudinales, se encuentran en el interior del ovario o del fruto.

Mutación somática: Es un cambio del genoma que afecta a las células somáticas de un organismo. Una vez que una célula sufre esta mutación, todas las células que derivan de ella por divisiones mitóticas, heredarán la mutación. Por tanto, el organismo en el que se ha producido una mutación somática posee un grupo de células con un genotipo diferente al del resto. Por definición, estos cambios no son hereditarios; sin embargo, las porciones de plantas con mutaciones somáticas, pueden originar nuevos individuos (por reproducción asexual), con dichas mutaciones.

Sarcotesta: Es la capa externa del tegumento del óvulo de algunas gimnospermas

NOMENCLATURA

AFLP:	Polimorfismo amplificado de longitud de fragmento
BApNA:	Hidrocloruro de N- α -benzoil-DL-arginina- ρ -nitroanilida
DMF:	Dimetil formamida
DO:	Densidad óptica
GA ₃ :	Ácido giberélico
GP:	Grado de purificación
p-NPA:	Acetato de para-nitro fenilo
TCA:	Ácido tricloroacético
U:	Unidad enzimática
U:	Ultravioleta

RESUMEN

Se caracterizó la actividad proteolítica del látex de los frutos inmaduros de toronche (*Vasconcella stipulata*), como especie representativa del género *Vasconcella* en el Ecuador.

Se realizaron pruebas preliminares para optimizar las condiciones de obtención y secado del látex, con frutos de babaco (*V. x heilbornii* var. babaco) y chamburo (*V. cundinamarcensis*). Luego, en las condiciones optimizadas, se obtuvieron látex secos de los frutos de chamburo (*V. cundinamarcensis*), de col de monte (*V. monoica*) y de toronche (*V. stipulata*) y con ellos se prepararon extractos acuosos, con una solución tampón fosfato de sodio 50 mM y pH 7,5. A continuación, se realizó una purificación primaria mediante la adición de etanol al 96% y se determinaron las actividades proteolítica y esterásica de los extractos semipurificados obtenidos. El látex de toronche fue el más activo, con valores de 49,98 U/ml de actividad caseinolítica; 0,116 U/ml de actividad esterásica con p-NPA y 0,327 U/ml de actividad proteolítica con BApNA.

Se eligió como método de determinación de la actividad proteolítica de los extractos obtenidos, al que emplea al sustrato cromogénico BApNA.

Posteriormente, con el extracto de toronche se llevó a cabo una cromatografía de filtración en gel y se determinó la concentración de proteína y la actividad proteolítica de cada fracción obtenida. Con el lote formado por las fracciones más activas resultantes, se realizó una cromatografía de intercambio iónico y se encontró que la fracción más activa presentó una actividad proteolítica con BApNA de 254,55 U/ml y su actividad específica correspondiente fue 339,59 U/mg.

Por último, se caracterizó cinéticamente la actividad proteolítica en la fracción más activa y se encontró que, de acuerdo con el modelo cinético de Michaelis – Menten, su $V_{\text{máx}}$ fue 159,11 U/ml y su K_M 1,80 mM, a las condiciones óptimas de pH y temperatura de 7,0 y 50° C, respectivamente.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las enzimas son sustitutas de varios reactivos químicos y sustancias sintéticas en muchos procesos industriales y su mercado global continúa creciendo lenta pero firmemente. Esto se debe a las ventajas relacionadas con su utilización, como producir una menor cantidad de reacciones y productos secundarios, ser biodegradables, tener una alta especificidad y poder ser empleadas en pequeñas cantidades para la transformación de grandes cantidades de sustrato en producto (Martínez y Cortés, 2 009).

Un caso de interés particular lo constituyen las proteasas. Estas enzimas permiten el ahorro de tiempos y costos de producción, el aprovechamiento mejorado de las materias primas y subproductos, así como la generación de desechos menos perjudiciales para el medio ambiente en diversas industrias alimenticias, cosméticas y farmacéuticas.

Se justifica, entonces, el interés actual en la búsqueda de nuevas fuentes de proteasas vegetales. Entre ellas, probablemente, la más conocida es la papaína, la cual es obtenida del látex de la papaya (*Carica papaya*).

Con estos antecedentes, el presente proyecto busca aislar, purificar y caracterizar cinéticamente las proteasas presentes en el látex de frutos de plantas del género *Vasconcella*, pues se considera que una de las posibilidades subutilizadas de las mencionadas plantas, es el uso del complejo proteolítico presente en ellas, conocido como babacaína, que tendría las mismas aplicaciones que la papaína (Scheldeman y Van Damme, 2 005)

El presente trabajó fue realizado como complemento de las investigaciones de Félix (2008), Gómez (2008) y Núñez (2 007), que son parte del proyecto de investigación PIC – 111, financiado por SENACYT, cuyo objetivo general es encontrar fuentes vegetales presentes en el Ecuador, para extraer proteasas con posibles aplicaciones industriales o farmacéuticas.

1. PARTE TEÓRICA

1.1. PLANTAS DEL GÉNERO *Vasconcella*

1.1.1. TAXONOMÍA

El género *Vasconcella*, que incluye 21 especies, fue definido como tal en el año 2 000 y es el más importante de la familia *Caricaceae* (Scheldeman y Van Damme, 2 005). En la Tabla 1.1, se detalla la clasificación taxonómica de este género.

Tabla 1.1. Clasificación taxonómica del género *Vasconcella*

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Dilleniidae
Orden	Violales
Familia	<i>Caricaceae</i>
Género	<i>Vasconcella</i>

(Rignanese, 2 006)

Una revisión taxonómica realizada mediante el análisis AFLP, en la Universidad de Gent, determinó que el género *Vasconcella*, como una delimitación taxonómica, está soportado incuestionablemente por varios análisis moleculares, que lo confirman como un género y no como una sección del género *Carica*. Sin embargo, los aspectos morfológicos por sí solos, no son suficientes para la diferenciación entre ambos géneros. Este estudio concluyó que una identificación

basada solo en características vegetativas, resulta complicada para el género *Vasconcella*, debido a la plasticidad fenotípica y a la intercompatibilidad entre varias especies (Kyndt, 2 005).

1.1.2. MORFOLOGÍA GENERAL

A excepción de una especie que es trepadora (*V. horovitziana*), las especies del género *Vasconcella* son arbustos semi-leñosos o árboles de crecimiento erecto. El tallo es meduloso (a diferencia de las especies del género *Carica*, que son de tallo hueco), en su mayoría sin protección especial (aunque las estípulas de *V. stipulata* pueden convertirse en espinas). Las hojas son generalmente enteras o lobuladas, solamente en *V. candicans* son acorazonadas y en *V. palandensis* se observan hojas compuestas, en forma de palmera.

Las plantas son generalmente dioicas, aunque pueden encontrarse especies monoicas (*V. monoica* y *V. cundinamarcensis*), la mayoría poseen flores unisexuales. Las inflorescencias masculinas son siempre de flores múltiples y usualmente de pedúnculo largo. Las inflorescencias femeninas son de flores simples con pedúnculo corto. Las flores tienen generalmente 5 pétalos con un pequeño cáliz y una corola tubular. Las flores masculinas muestran estambres con filamentos libres o fusionados, por encima de la corola. Las flores femeninas muestran un ovario incompleto de 5 lóculos, con 5 estigmas enteros o enramados.

La polinización entre flores de diferentes plantas puede ocurrir mediante los insectos. En el caso del híbrido natural *Vasconcella x heilbornii*, los frutos se dan de forma partenocárpica, sin necesidad de polen. No obstante, la presencia de polen puede inducir a la formación de unas pocas semillas viables.

El fruto de estas plantas es una baya de sección pentagonal, con semillas usualmente rodeadas por una sarcotesta gelatinosa (Scheldeman y Van Damme, 2 005).

En la Figura 1.1, se muestra la fotografía de una planta de babaco, con varios frutos verdes.



Figura 1.1. Hojas, tallos y frutos en una planta de babaco (*Vasconcella x heilbornii* var. babaco)
(Scheldeman y Van Damme, 2 005)

1.1.3. PROPAGACIÓN Y CICLO DE CULTIVO

Las especies del género *Vasconcella*, generalmente, son propagadas por semillas, aunque en algunas especies es posible la propagación vegetativa por esquejes. La germinación de las semillas puede ser lenta (de aproximadamente 30 días) y difícil, pero siempre mejora si se aplica una inmersión previa de 24 horas en ácido giberélico (GA_3). En el caso del híbrido natural *Vasconcella x heilbornii*, la propagación mediante esquejes es sencilla; sin embargo, con el propósito de ampliar la variabilidad de las nuevas plantas, se puede utilizar GA_3 para estimular la germinación de las semillas viables que se encuentren en los frutos. También es posible realizar injertos entre especies, sobre todo con el fin de evitar algunos hongos y nemátodos de las especies sensibles (Harling, 1 990).

La determinación del sexo solo puede efectuarse en la primera floración, de manera que es aconsejable realizar una plantación múltiple y luego de la primera

floración, seleccionar las plantas femeninas. Sin embargo, en especies dioicas, es necesario mantener algunos polinizadores masculinos para una adecuada frutación.

En el caso de los frutos partenocárpicos de *Vasconcella* × *heilbornii*, su propagación por esquejes da como resultado campos homogéneos de plantas femeninas. La floración comienza, según la especie, algunos meses después del trasplante y los primeros frutos pueden ser cosechados 6 meses más tarde (Scheldeman y Van Damme, 2 005).

1.1.4. DISTRIBUCIÓN Y PRESENCIA DEL GÉNERO *Vasconcella* EN EL ECUADOR

Las especies del género *Vasconcella* pueden encontrarse en estado silvestre, en una amplia área de distribución ecológica, desde tierras costaneras de clima tropical seco, hasta bosques húmedos subtropicales y regiones templadas. No obstante, su centro de diversidad se encuentra en el altiplano andino, desde Colombia hasta Perú, con un área de gran biodiversidad y endemismo (“hot spot”) en el sur de Ecuador y en el norte de Perú (Scheldeman y Van Damme, 2 005).

En el Ecuador están presentes 15 especies del género *Vasconcella*; 9 de ellas en el sur del país, en un área de 39 987 km². En su mayor parte, las plantas de este género crecen en estado silvestre, a más de 1 000 metros sobre el nivel del mar (Scheldeman, 2 002).

Los frutos de estas especies son consumidos de forma cruda o preparada, en especial por los pueblos indígenas en las provincias de Azuay, Carchi, Cotopaxi, Imbabura, Loja, Napo, Pichincha, Sucumbíos, Tungurahua, Manabí, El Oro, Esmeraldas, Guayas, Los Ríos, Pastaza, Bolívar y Zamora (CIRAD, 2 000).

La Figura 1.2 muestra una fotografía de frutos de varias especies del género *Vasconcella*, recolectadas en el Ecuador.



Figura 1.2. Frutos de algunas plantas del género *Vasconcella*, recolectados en la provincia de Loja, Ecuador.
(Scheldeman y Van Damme, 2 005)

En la Tabla 1.2, se presenta una lista de las especies del género *Vasconcella* que han sido encontradas en el Ecuador, las subespecies o las variedades existentes, el nombre común y las provincias en donde se ubican.

Tabla 1.2. Especies del género *Vasconcella* presentes en el Ecuador

Especie	Subespecie o variedad	Nombre Común	Ubicación en el Ecuador
<i>V. candicans</i>		Chungay, toronche chicote, mito	Sur de Ecuador
<i>V. cundinamarcensis</i>		Toronche, chamburo, papaya de tierra fría, siglalón	Azuay, Carchi, Cotopaxi, Imbabura, Loja, Napo, Pichincha, Sucumbíos, Tungurahua
<i>V. horovitziana</i>		Papayuela de bejuco, badea de monte	Manabí, Pichincha
<i>V. microcarpa</i>	- <i>baccata</i> - <i>microcarpa</i> - <i>pilifera</i> - <i>heterophylla</i>	Col de monte, sapiro, lechoso de monte, higuillo “mamao rana”	Cotopaxi, El Oro, Esmeraldas, Guayas, Los Ríos, Manabí, Morona, Napo, Pastaza, Pichincha, Tungurahua
<i>V. monoica</i>		Col de monte, peladera, col de montaña, yumbo papaya, berenjena, toronche, chamburo	Morona, Napo, Pastaza, Loja
<i>V. omnilingua</i>		Col de monte	El Oro
<i>V. palandensis</i>		Papaillo	Sur de Ecuador
<i>V. parviflora</i>		Papaya de monte, coral, papayillo, yuca del campo	El Oro, Guayas, Loja, Los Ríos, Manabí
<i>V. pulchra</i>		Col de monte	Bolívar, Pichincha
<i>V. sprucei</i>			Napo, Tungurahua
<i>V. stipulata</i>		Toronche, siglalón silvestre	Azuay, Loja
<i>V. weberbaueri</i>		Mausha	Loja
<i>V. × heilbornii</i>	Variedades: - <i>fructifragrans</i> - <i>chrysopetala</i> - <i>babaco</i>	Toronche, chihualcán, babaco, chamburo	Azuay, Bolívar, Zamora, Chimborazo, Loja, Pichincha, Tungurahua

(Scheldeman y Van Damme, 2005; University of Göteborg y CIRAD-FLHOR/IPGRI, 2 000)

1.1.5. IMPORTANCIA ECONÓMICA

En comparación con la papaya (*C. papaya*), las especies del género *Vasconcella* son económicamente menos importantes.

En la actualidad, sólo el híbrido natural conocido con el nombre de babaco, es cultivado comercialmente en Ecuador y obtiene atención del mercado internacional, que se expande continuamente hacia nuevas frutas subtropicales.

En 1 996 la producción de babaco en el Ecuador fue de 632 toneladas métricas. En 2 002 empezó la exportación de este fruto; según datos de la Corporación de Promoción de Exportaciones e Inversiones (CORPEI), en el 2 003, se registraron los valores más altos de exportaciones, con 5 793 toneladas, pero, entre 2 005 y 2 006, el volumen bajó a 793 toneladas (CORPEI, 2 006).

El cultivo de babaco ha sido introducido con fines comerciales en otros países como Nueva Zelanda, Australia, Italia, España, Francia, Sudáfrica, Suiza, Canadá y Holanda. Sin embargo, los resultados han sido poco satisfactorios, debido a factores como la necesidad de usar invernaderos para su cultivo, el tamaño del fruto y una inversión insuficiente en publicidad (Scheldeman, 2 002).

Con respecto a las otras especies, se puede mencionar que el chamburo (*V. cundinamarcensis*) es cultivado en los Andes ecuatorianos en pequeña escala y sus frutos son comercializados en mercados internos; mientras que agricultores de la provincia de Tungurahua dirigen sus esfuerzos hacia la comercialización de frutos de toronche (*V. stipulata*), por ser de menor tamaño y tener un sabor más intenso que el babaco (Scheldeman, 2 002).

1.1.6. USOS POTENCIALES

El consumo de los frutos de las especies del género *Vasconcella* es el principal uso en la actualidad. Los frutos son consumidos en forma cruda o preparada, en jugos, néctares, dulces, conservas y otros productos agroindustriales, en los

cuales la adición de azúcar realza el aroma. Por ejemplo, la Figura 1.3 presenta la imagen de varios frascos de mermelada de chamburo, que se comercializa dentro y fuera del país.



Figura 1.3. Mermelada de chamburo “La Carlita” elaborada por el grupo El Salinerito en la provincia de Bolívar, Ecuador.
(Grupo Salinas, 2 008)

Las plantas de este género, conocidas también como papayas de alta montaña, aún poseen una gran cantidad de posibilidades subutilizadas. Una de ellas se relaciona con la extracción y caracterización de un complejo proteolítico conocido como babacaína a partir del látex de sus frutos, el cual tendría una actividad proteolítica hasta 20 veces superior a la actividad de la papaína obtenida de *Carica papaya* (Scheldeman y Van Damme, 2 005).

Si se considera que el creciente negocio mundial relacionado con la papaína, actualmente, se calcula en unos 100 millones de dólares anuales, se puede prever que existe un mercado potencial muy importante para la babacaína, por tener las mismas aplicaciones industriales. Debido a esto, se incrementaría el interés por el cultivo de plantas del género *Vasconcella* en el Ecuador, que cuenta con varias zonas que brindan las condiciones ideales para esta actividad e incluso ha sido calificado como un centro de alta biodiversidad de las papayas de alta montaña (Scheldeman, 2 002).

La resistencia ante algunas enfermedades importantes, como las que son producidas por los hongos *Fusarium* y los nemátodos *Meloidogyne*, está presente en varias especies del género *Vasconcella*. Por tal motivo, estas plantas pueden ser utilizadas en la reproducción o el cultivo de especies como la papaya o el babaco, que son muy susceptibles a dichas enfermedades; a manera de plantas huésped en una reproducción por injertos o como fuente de genes para la obtención de plantas transgénicas.

Adicionalmente, se podría ampliar la base genética del género *Vasconcella*, gracias a la facilidad de cruzamiento entre especies y las constantes mutaciones somáticas que se dan en la propagación vegetativa (Scheldeman y Van Damme, 2 005).

1.2. DESCRIPCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL LÁTEX DE LAS PLANTAS DEL GÉNERO *Vasconcella*

1.2.1. DESCRIPCIÓN DEL LÁTEX DE LAS PLANTAS DEL GÉNERO *Vasconcella*

El látex de las plantas de este género no ha sido ampliamente estudiado; entre las fuentes consultadas, únicamente se encontraron publicaciones acerca del chamburo (*V. cundinamarcensis*) y del babaco (*V. × heilbornii* var. babaco).

El látex del babaco fue definido por Marcillo (2 005) como “un fluido lechoso de color blanquecino, no muy denso, presente en hojas, tallo y frutos”, descripción que puede aplicarse al látex de las demás plantas del género *Vasconcella*. La Figura 1.4 presenta la fotografía de un fruto del género *Vasconcella*, en el que se han realizado varios cortes con el fin de obtener su látex.



Figura 1.4. Látex exudado de un fruto del género *Vasconcella*.
(Scheldeman y Van Damme, 2 005)

1.2.2. CARACTERIZACIÓN DEL LÁTEX DE PLANTAS DEL GÉNERO *Vasconcella*

Para caracterizar al látex de las plantas del género *Vasconcella*, se consideró como referencia un estudio acerca del efecto de dos tipos de secado en la actividad enzimática del látex de babaco (Marcillo, 2 005). En la Tabla 1.3 se presentan los contenidos de proteínas, lípidos, carbohidratos y humedad del látex de frutos de babaco.

Tabla 1.3. Contenido porcentual de humedad, proteínas, lípidos y carbohidratos del látex de babaco (*V. × heilbornii* var. babaco)

Propiedad	Valor
Humedad (%)	79,24 ± 0,40
Proteínas (%)	13,14 ± 0,26
Lípidos (%)	2,18 ± 0,05
Carbohidratos (%)	3,01 ± 0,30
Cenizas (%)	1,09 ± 0,02

(Marcillo, 2 005)

La actividad enzimática de las proteasas del látex de babaco estuvo comprendida entre 1,31 y 1,82 U/g látex liofilizado. Dicha actividad se definió como la cantidad de enzima que se requiere para obtener 1 μ mol de p-nitroanilina, por minuto, a pH 7,5 y temperatura ambiente (Marcillo, 2 005).

1.2.3. EL LÁTEX DE *Carica papaya*

La papaya (*Carica papaya*), especie del género *Carica* y de la familia *Caricaceae*, contiene látex, el cual es exudado por sus frutos al ser sesgado o puncionado su epitelio y es un factor crucial en la defensa del árbol contra ataques de insectos (Jiménez, 2 002).

Los principios activos de este látex, responsables de su valor en muchas aplicaciones industriales, son las enzimas proteolíticas papaína y quimopapaína. Se ha demostrado que la conversión de la forma inactiva a la activa, ocurre cuando el látex es expelido y alcanza un máximo de actividad proteolítica en menos de 2 minutos, después del corte o pinchazo en la superficie del fruto. Paralelamente a este proceso, se hacen visibles los síntomas de coagulación del látex, lo que evidencia que este elemento es un factor de primera línea de defensa en plantas, pues los coágulos de látex sellan las heridas y evitan el ingreso de patógenos (Gómez, 2 002). Cabe aclarar que el producto comercial (el látex seco) también es conocido como papaína. (Robles, 2 001).

Poco a poco, el látex de la papaya se ha convertido en un negocio industrial y farmacéutico, que se comercializa en todo el mundo, con acentuada demanda en los mercados europeos y norteamericanos.

1.3. PROTEASAS PRESENTES EN EL LÁTEX DE ALGUNAS ESPECIES VEGETALES

1.3.1. GENERALIDADES DE LAS ENZIMAS

1.3.1.1. Definición

Las enzimas son catalizadores de las reacciones químicas en los seres vivos, es decir, son sustancias que sin consumirse en una reacción, incrementan notablemente su velocidad (McCormack, 2 007).

En una reacción catalizada por una enzima:

- a) La sustancia sobre la que actúa la enzima se denomina sustrato.
- b) El sustrato se une a una región específica de la enzima, llamada centro activo y forma un estado intermedio denominado complejo enzima-sustrato. El centro activo comprende un sitio de unión formado por los aminoácidos que están en contacto directo con el sustrato y un sitio catalítico, formado por los aminoácidos directamente implicados en el mecanismo de la reacción.
- c) Una vez formados los productos, la enzima regresa a su forma inicial y puede comenzar un nuevo ciclo de reacción (Boyer, 2 000).

1.3.1.2. Propiedades

Por tener una estructura proteica, las enzimas poseen una conformación natural más estable que las demás conformaciones posibles, en la cual son funcionales, de modo que los cambios en la conformación de las enzimas suelen ir asociados con alteraciones en su actividad catalítica.

Las enzimas son catalizadores específicos, cada enzima cataliza un solo tipo de reacción y casi siempre actúa sobre un único sustrato o sobre un grupo muy reducido de ellos. Tienen una alta eficiencia y no se consumen en las reacciones,

por tales razones, con poca cantidad de ellas se pueden transformar en producto grandes cantidades de sustrato. En las reacciones reversibles, las enzimas pueden actuar tanto en un sentido de la reacción como en el otro, dependiendo de la concentración del sustrato (Boyer, 2 000).

1.3.2. PROTEASAS

1.3.2.1. Descripción

Las proteasas, conocidas también como peptidasas o enzimas proteolíticas, catalizan reacciones de hidrólisis, que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas o de las cadenas polipeptídicas y dan como resultado péptidos más pequeños o aminoácidos libres.

Las proteasas que se encuentran en los organismos vivos, están implicadas en una gran variedad de reacciones fisiológicas; desde la digestión de las proteínas de los alimentos hasta procesos altamente regulados, como la coagulación sanguínea, la muerte celular y la diferenciación de tejidos (González, 2 004).

1.3.2.2. Clasificación

De acuerdo con la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (UIBBM), las proteasas reciben el código EC 3.4, por ser hidrolasas que catalizan la ruptura de enlaces peptídicos (Moss, 2 008).

Las proteasas se clasifican en endopeptidasas o proteinasas y exopeptidasas, de acuerdo con la ubicación del sitio en que se hidroliza la molécula del sustrato.

Las endopeptidasas hidrolizan a las proteínas en las regiones interiores de su cadena polipeptídica. Según su mecanismo catalítico, se clasifican en:

a) Serino proteinasas (EC 3.4.21.n)

- b) Cisteíno proteinasas (EC 3.4.22.n)
- c) Aspártico proteinasas (EC 3.4.23.n)
- d) Metalo proteinasas (EC 3.4.24.n)

1.3.2.3. Cisteíno proteinasas

Las cisteíno proteinasas poseen un grupo cisteíno en su sitio activo. Suelen ser activadas mediante el empleo de agentes reductores, como el ácido cianhídrico (HCN) o la cisteína. En su mayoría, estas enzimas presentan una actividad óptima a valores ácidos o neutros de pH (Grudkowska y Zagdańska, 2 004).

Este grupo incluye más de 40 familias de enzimas, agrupadas en 6 superfamilias o clanes. En el reino vegetal, las cisteíno proteinasas se encuentran en las plantas de las familias *Caricaceae*, *Bromeliaceae* y *Moraceae*.

Dentro de las cisteíno proteinasas, se incluyen algunas enzimas de notable importancia industrial, como la papaína, la quimopapaína, la bromelina y la ficina.

1.3.2.3.1. Papaína

La papaína (EC 3.4.22.2) es una enzima proteolítica que se obtiene del látex de frutos verdes de papaya (*Carica papaya*). Posee un peso molecular de 23 kDa y está formada por una cadena peptídica de 211 residuos de aminoácidos.

La papaína se activa mediante agentes reductores, como cisteína, cianuro de sodio o sulfitos y es inactivada por agentes oxidantes, como los iones de metales pesados e incluso el oxígeno atmosférico.

El pH óptimo de esta proteasa se encuentra entre 6 y 7; mientras que su punto isoeléctrico corresponde a un pH de 9,6 (Worthington, 2 008). La temperatura óptima para la acción de la papaína es de 65° C (Sigma, 2 008).

La papaína, en forma de suspensión, es estable a 5° C durante 6 a 12 meses. El EDTA, la cisteína y el dimercaptopropanol son agentes estabilizadores.

La actividad de la papaína puede ser determinada mediante la velocidad de hidrólisis de una proteína o de sustratos sintéticos de bajo peso molecular, tales como ésteres o amidas derivadas de aminoácidos (Álvaro y otros, 2 002).

La papaína es empleada en varias industrias de gran importancia, como en la industria cervecera, para la prueba de enfriamiento de la cerveza; en la industria farmacéutica como sustancia auxiliar de la digestión, en tratamientos de enfermedades de la piel y en diversas preparaciones medicinales. Tal vez su uso industrial más importante es como ablandador de carne. También se la emplea en el desgomado de la piel, para la elaboración de cueros; en detergentes; en la elaboración de quesos y panes; en preparados de proteínas modificadas para alimentación humana y animal; en el procesamiento de fibras textiles y en el tratamiento de efluentes industriales (Glibota y otros, 2 000).

Su importancia económica es considerable puesto que representa las dos terceras partes del mercado de enzimas. El crecimiento del negocio relacionado con ella ha sido tal en los últimos años, que en la actualidad se calcula en unos 100 millones de dólares anuales, de los cuales el 70% pertenece a las industrias relacionadas con la alimentación (Hernández, 2 007).

1.3.2.3.2. Quimopapaína

La quimopapaína (EC 3.4.22.6) es la endopeptidasa más abundante en el látex de la papaya (*Carica papaya*). Se diferencia de la papaína por su movilidad electroforética, su solubilidad y la especificidad del sustrato. Se conoce de ella, además de su estructura primaria, que su masa molecular es de 24 kDa y su punto isoeléctrico se encuentra entre 10,1 y 10,6.

La quimopapaína es eficaz en el tratamiento de las hernias discales, se inyecta directamente en los discos intervertebrales (quimionucleolisis), ya que hidroliza

los proteoglicanos que se originan en dichos discos cuando éstos se degeneran (Campos, 2 001).

Son inhibidores de la quimopapaína iones de algunos metales pesados, como Ag^+ , Cu^{2+} y Zn^{2+} . En cambio, la cisteína, el dimercaptopropanol y el ácido tio glicólico son activadores de esta enzima.

El pH óptimo de la quimopapaína para la digestión de la caseína y la hemoglobina es de 7,2, con un máximo de 9.

En cuanto a la estabilidad durante el almacenamiento, la enzima seca se mantiene estable durante un mes a una temperatura de -20°C , pero pierde un 15% de su actividad en dos semanas, si es almacenada a 4°C (BRENDA, 2 007).

1.3.2.3.3. Bromelina

La bromelina es una cisteíno proteinasa aislada y purificada a partir de los órganos de plantas de piña (*Ananas comosus*), que pertenece a la familia de la papaína (Rowan y otros, 1 990).

A esta enzima le corresponden dos códigos, de acuerdo con el lugar de la planta del cual es extraída:

- a) EC 3.4.22.32, correspondiente a la bromelina de tallo.
- b) EC 3.4.22.33, correspondiente a la bromelina de fruta.

El peso molecular de la bromelina es de aproximadamente 33 kDa. El punto isoeléctrico de la bromelina de tallo es 9,5, el de la bromelina de fruta es relativamente más bajo.

La cisteína y el cianuro de sodio funcionan como activadores de la bromelina. El pH óptimo de esta enzima es de 7 y la temperatura óptima es 60°C (Hernández y otros, 2 005).

Con respecto al almacenamiento, esta enzima se mantiene estable a -20°C , en forma seca (BRENDA, 2 007).

La bromelina posee diversas aplicaciones industriales. Esta enzima es utilizada en la obtención de hidrolizados de proteínas para alimentación animal y humana. En la industria alimenticia se emplea para ablandar las envolturas de las salchichas. Puede sustituir a la papaína en el tratamiento para clarificación y almacenamiento de cerveza, para ablandar carne y para la hidrólisis de gelatina (Hernández y otros, 2 005).

1.3.2.3.4. Ficina

La ficina (EC 3.4.22.3) es una enzima proteolítica que se obtiene del látex de los árboles del género *Ficus*, como *Ficus glabrata*, *Ficus elastica* y *Ficus carica*. Tiene características similares a la papaína, con respecto a sus condiciones óptimas de pH, temperatura y estabilidad (Álvaro y otros, 2 002).

La cistatina y el ácido iodoacético son inhibidores de la ficina, mientras que la cisteína y el mercaptoetanol son activadores de esta enzima. El pH óptimo de la ficina es 7,5. A un pH de 5,0 esta enzima tiene un 50% de su actividad máxima y a un pH de 9,0 tiene un 55% de su actividad máxima (BRENDA, 2 008).

Las soluciones acuosas de ficina pierden actividad después de prolongados periodos de almacenamiento, en estado congelado. Mientras que, a temperatura ambiente, pierde un 10% de su actividad por año (Álvaro y otros, 2 002).

La ficina puede ser empleada en todas las industrias que usan otras proteasas vegetales. En Perú, el producto se conoce como leche de oje, y se usa como antihelmíntico humano, por su acción proteolítica (Giove, 1 996).

1.3.2.4. Actividad proteolítica en plantas del género *Vasconcella*

Luego de haber observado síntomas de irritación severa en la piel de los recolectores de frutos de plantas del género *Vasconcella*, se llevaron a cabo ensayos enzimáticos con el látex de dichos frutos con el propósito de determinar su actividad proteolítica. Las muestras fueron recolectadas en Loja, Ecuador.

El látex fue extraído de frutos verdes, mediante cortes de 2 mm de profundidad, y secado a 55°C, durante 24 horas. Para determinar la actividad proteolítica de los polvos de látex obtenidos, se utilizó el método BAPA, que consistió en medir, durante 5 minutos, la densidad óptica a 405 nm, de la mezcla de reacción que tuvo al hidrocloreuro de N- α -benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPA o DL-BApNA) como sustrato. El ensayo fue realizado a 25° C.

La unidad de actividad proteolítica se definió como la cantidad de enzima que se requiere para producir 1 μ mol de p-nitroanilina por minuto (Scheldeman y otros, 2 003).

En la Tabla 1.4 se muestran los valores de la actividad proteolítica en el látex de frutos de papaya y de cinco especies del género *Vasconcella*, como resultado del estudio mencionado.

Tabla 1.4. Actividad proteolítica de algunas especies del género *Vasconcella*

Especie	Actividad proteolítica (mU BApNA/mg látex seco)
<i>Carica papaya</i> (referencia)	10,4
<i>V. × heilbornii</i> var. babaco	38,1
<i>V. × heilbornii</i> var. chrysopetala	127,6
<i>V. stipulata</i>	129,4
<i>V. cundinamarcensis</i>	57,0
<i>V. monoica</i>	55,1

(Scheldeman y otros, 2 003)

1.4. AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

Un proceso general de aislamiento y purificación de enzimas consta de las siguientes etapas:

- a) Preparación de la muestra
- b) Extracción de la proteína
- c) Purificación primaria
- d) Purificación secundaria

Cada una de estas etapas se realiza de una forma específica, de acuerdo con el tejido o muestra del que se parte, la ubicación de la proteína, que puede ser intra o extracelular, la consistencia del extracto enzimático que se obtenga, la presencia de partículas diferentes a las enzimas de interés y las características de las enzimas proteolíticas que puedan usarse para una purificación, como peso molecular, punto isoeléctrico, entre otras.

Por tal razón, el aislamiento y la purificación de enzimas a partir de látex, deben ser realizados a través de un proceso determinado por las características específicas de la fuente, del látex y de las enzimas que él contiene.

1.4.1. SELECCIÓN DE LA FUENTE

Para una adecuada selección de la fuente de las enzimas, es necesario considerar los siguientes criterios:

- a) Tener la cantidad suficiente de tejido o secreción de la cual se va a aislar la proteína.
- b) Escoger un tejido o secreción que contenga un porcentaje significativo de enzimas.
- c) Determinar las mejores condiciones para la extracción del tejido o la secreción vegetal; tales como estado de madurez de la planta o el órgano vegetal, temperatura de extracción, presencia de estabilizantes o inhibidores, tiempo

de extracción, etc. Estudios realizados recomiendan seleccionar las plantas que tengan frutos verdes, debido a que en ellos se encuentra una mayor cantidad de látex, con una elevada actividad enzimática (Reyes, 2 005).

- d) Mientras se lleva la muestra al laboratorio y se empieza con el aislamiento de las enzimas, mantener el tejido bajo condiciones que contribuyan a una mejor conservación del mismo, que no afecten considerablemente a la actividad enzimática que se va a recuperar.

Adicionalmente, es necesario tener en cuenta las precauciones que deben tenerse cuando se trabaja con enzimas. Por ejemplo, considerar que condiciones extremas de temperatura y pH pueden desnaturalizar a las enzimas o afectar irreversiblemente su actividad. Algo similar sucede con la presencia de ciertas sustancias químicas o incluso con procesos físicos, como una excesiva agitación.

1.4.2. ACONDICIONAMIENTO DEL LÁTEX

Por lo general, el látex se comercializa como producto seco, en forma de polvo; de esta forma, se conserva adecuadamente hasta el momento de su utilización, aumenta su vida útil y se facilita su manipulación y almacenaje, con respecto al producto fresco (Alcayaga, 2 004).

Para tal efecto puede aplicarse uno de los siguientes métodos:

- a) Liofilización.
- b) Secado al vacío.
- c) Secado en estufa, a temperaturas controladas.

Además, es recomendable tener un conocimiento previo de algunas características de las enzimas a ser aisladas, con el fin de llevar a cabo un proceso más acertado, que afecte lo menos posible a la actividad enzimática deseada.

Por ejemplo, es importante saber que las proteasas, en condiciones de baja fuerza iónica, se vuelven inestables. Por esa razón, es necesario regular el pH

con el uso de soluciones tampón de concentraciones medias y pH generalmente fisiológico (Universidad de Carabobo, 2 006).

Luego de analizar los factores anteriormente mencionados, se procede a determinar el proceso de homogeneización que se va a aplicar. Especial cuidado se debe tener con el tiempo, la temperatura y el pH de trabajo, así como con las operaciones complementarias que se vayan a utilizar, en caso de ser necesarias, como por ejemplo la centrifugación o la filtración.

1.4.3. PURIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS

La purificación de las enzimas es un proceso que debe considerar la poca estabilidad que presentan estos biocatalizadores, la generalmente baja concentración en la que se encuentran en el material de partida y la presencia de otros elementos en el preparado enzimático (Ayala, 2 005).

Existen dos grupos principales de técnicas de purificación: las de baja resolución y las de alta resolución.

El primer grupo corresponde a técnicas de purificación basadas en la diferencia de solubilidad. Con ellas se eliminan los contaminantes más abundantes y se concentra la proteína deseada en el preparado. Estas técnicas poseen una gran capacidad de procesamiento, pero un bajo poder resolutivo. Entre ellas se encuentra la precipitación con solventes orgánicos.

Las técnicas de alta resolución no permiten una purificación de la proteína en un solo paso. Es necesario combinar, complementariamente, varias de ellas para alcanzar una alta pureza. Estas técnicas tienen un alto poder resolutivo y una baja capacidad de proceso. Entre ellas se pueden mencionar la cromatografía de filtración en gel y la cromatografía de intercambio iónico (Chávez, 1 990).

Estas técnicas de purificación pueden ser combinadas para obtener mejores resultados en el producto final.

1.4.3.1. Precipitación con solventes orgánicos

Los solventes orgánicos miscibles con el agua, como el etanol o la acetona, producen una variedad de efectos que, combinados, permiten la precipitación de las proteínas, al ser adicionados a una solución acuosa. El principal efecto es la reducción del poder de solvatación del agua, que puede ser explicado en términos de una reducción de su constante dieléctrica. La estructura ordenada del agua, alrededor de los aminoácidos hidrofóbicos, es desplazada por el solvente orgánico añadido. El efecto neto de este proceso es la disminución de la solubilidad de las proteínas en el medio, debido a lo cual se agregan y precipitan (Calvo, 2 003).

Los precipitados son agregados de moléculas proteicas en cantidad suficiente, de modo que puedan ser centrifugados a una velocidad razonablemente baja (Álvaro y otros, 2 002).

Para la selección de un adecuado solvente orgánico se deben considerar los siguientes criterios:

- a) El solvente debe ser completamente miscible en agua,
- b) El solvente no debe producir una reacción con la proteína y
- c) El solvente debe garantizar una precipitación alta (Álvaro y otros, 2 002).

1.4.3.2. Cromatografía de filtración en gel

Las cromatografías son técnicas de separación selectiva de moléculas, con las que los componentes de una mezcla compleja pueden ser purificados. Existen varios tipos de cromatografías, según los fundamentos en que se basan para hacer los análisis, pero todas consisten de una fase estacionaria y una móvil.

En la cromatografía de columna las moléculas de una mezcla son separadas de acuerdo con su afinidad por la fase estacionaria o por la fase móvil (Vélez, 2 005).

La cromatografía de filtración en gel emplea matrices formadas por esferas porosas. Los poros tienen un volumen elevado y un diámetro determinado (10 – 500 μm). Cuando penetra en el lecho de la columna una solución que contiene proteínas de tamaños distintos, las moléculas de menor o igual tamaño que el de los poros son retenidas en los poros de las esferas, a lo largo de la columna; mientras que las moléculas de proteína, cuyo tamaño es mayor al de los poros, no penetran en ellos y por tanto se desplazan con el flujo que atraviesa la columna (Caballero y otros, 2 008).

El flujo de solvente que atraviesa la columna por el espacio entre las esferas es más elevado que el del solvente que circula por el interior de los poros de las esferas; por este motivo, el efecto neto es que se acelera el desplazamiento de las proteínas de mayor tamaño, respecto al de las de menor tamaño. En esta cromatografía se eluyen primero las proteínas de mayor tamaño y luego, las de tamaño menor.

En la Figura 1.5, se esquematiza el funcionamiento de la cromatografía de filtración en gel, también conocida como cromatografía de exclusión.

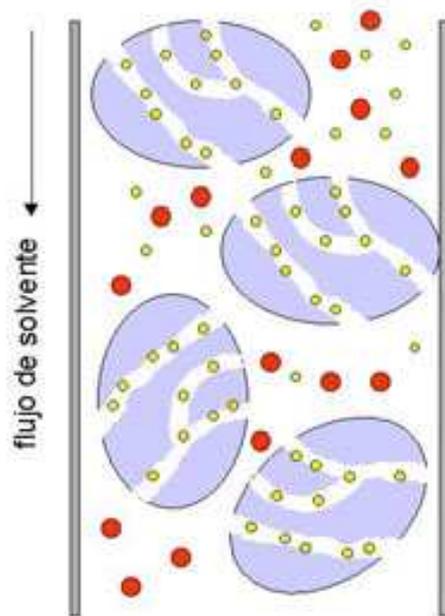


Figura 1.5. Esquema de la cromatografía de filtración en gel
(Reina, 2 003)

La longitud y el volumen de la columna tienen una gran influencia en el resultado de la filtración. Columnas largas aseguran separaciones de mayor calidad. Con el empleo de patrones de proteínas de peso molecular o tamaño conocido, se puede determinar el peso molecular de proteínas de tamaño desconocido (Reina, 2 003).

El material que se escoja para la fase estacionaria dependerá del tipo de muestra que se vaya a filtrar. Cada tipo de gel presenta poros de distinto tamaño.

1.4.3.3. Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico se basa en la carga eléctrica neta que tienen las proteínas a un valor de pH determinado.

La matriz o relleno de la columna es un polímero sintético que contiene grupos cargados positiva (catiónicos) o negativamente (aniónicos). Cuando en el lecho de la columna penetra una solución que contiene varios tipos de proteína, serán retenidas en la columna las proteínas que tengan carga opuesta a la de la matriz, con distintos grados de afinidad, y las restantes serán eluidas (Medina, 2 005).

Para eluir las proteínas retenidas se puede variar la carga iónica del solvente o su pH de forma que se alcance el punto isoeléctrico de la proteína de interés o el de la matriz, neutralizando, de este modo, la fuerza que retiene a las proteínas en la columna (Reina, 2 003).

En la Figura 1.6, se esquematiza el funcionamiento de la cromatografía de intercambio iónico, con un relleno cargado positivamente.

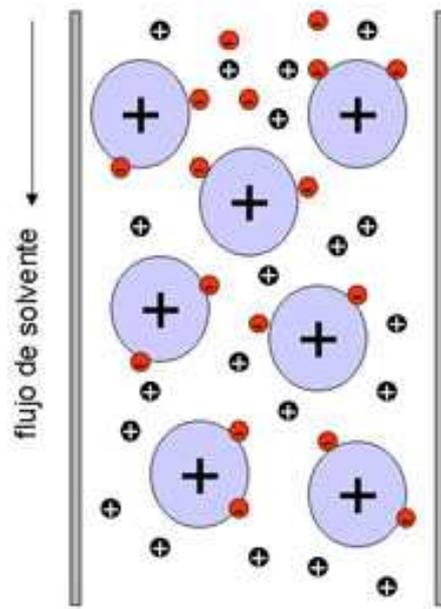


Figura 1.6. Esquema de la cromatografía de intercambio iónico (Reina, 2 003)

Las moléculas cargadas negativamente son retenidas por la matriz, mientras las partículas con carga positiva son eluidas.

1.4.4. DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA EN LOS EXTRACTOS OBTENIDOS

Dentro de un estudio enzimático es importante determinar la concentración de proteína presente en los extractos obtenidos en cada etapa del proceso de purificación, con el fin de relacionar esta información con la actividad enzimática y conocer el rendimiento y el grado de purificación en cada paso.

Entre los métodos utilizados para la determinación de la concentración de proteína, se encuentra el método de absorción UV a 280 nm. Este método permite estimar cuantitativamente dicha concentración en una muestra, de acuerdo con la Ley de Lambert-Beer, puesto que las proteínas poseen un máximo de absorción aproximadamente a una longitud de onda de 280 nm, debido a la presencia de aminoácidos aromáticos, fundamentalmente tirosina y triptófano (Yáñez, 2 006).

En una muestra que contiene proteínas, el solvente no debe absorber la luz a 280 nm y la solución debe ser clara e incolora. La turbidez puede producir resultados erróneos; entonces, para emplear este método de manera confiable, puede ser necesario realizar un proceso de filtrado, de centrifugación o de dilución de la muestra.

Este método es rápido y relativamente sensible. Es utilizado frecuentemente en la detección post-columna de proteínas. Al ser una técnica no destructiva, la cantidad de muestra empleada para la estimación cuantitativa, puede ser devuelta a la muestra original (Yáñez, 2 006).

En óptica, la ley de Lambert-Beer es una relación empírica que combina la absorción de luz con las propiedades del material atravesado.

La Ecuación 1.1 expresa la relación entre la absorbancia y la concentración de una sustancia en una solución.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad [1.1]$$

Donde:

A es la absorbancia.

ε es el coeficiente de extinción, en $(\text{mg/ml})^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

c es la concentración de la sustancia absorbente en la muestra, en mg/ml.

l es la distancia que la luz atraviesa por la muestra, en cm.

La ley establece que existe una relación exponencial entre la transmisión de luz a través de una sustancia y la concentración de la sustancia, así como también entre la transmisión y la longitud del cuerpo que la luz atraviesa. Si se conoce el coeficiente de extinción (ε) de una molécula determinada y la distancia (l) que el rayo de luz atraviesa por la muestra, la concentración de la molécula puede ser calculada al medir la absorbancia de la solución que la contiene.

Para estas mediciones, se pueden utilizar espectrofotómetros que posean doble haz de luz, con el fin de medir el valor exacto de absorbancia de una muestra, al compararlo directamente con un blanco, en cada medición.

Se debe fijar la longitud de onda en el valor en el cual la sustancia analizada presenta una máxima absorbancia, en el rango del espectro visible (400 a 700 nm) o en el ultravioleta (200 a 400 nm) (Skoog y otros, 2 001).

1.4.5. MEDICIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

1.4.5.1. Unidades enzimáticas

La cantidad de enzima en una muestra puede ser expresada en moles, como la de cualquier otro compuesto químico, o puede ser cuantificada en términos de actividad enzimática. La actividad enzimática es una medida de la cantidad de enzima activa presente y del nivel de actividad de la misma, por lo que su medida es dependiente de las condiciones de trabajo que deben ser especificadas cuando se dan valores de actividad.

La actividad expresa la cantidad de sustrato convertido en producto por unidad de tiempo, en un volumen dado de reacción.

En el Sistema Internacional de Unidades la unidad para la actividad catalítica es el katal (kat), pero es una unidad demasiado grande y suele usarse la unidad de actividad enzimática (U). Su equivalencia está dada por (González, 2 004):

$$1 \text{ kat} = 1 \text{ mol sustrato convertido} \times \text{s}^{-1} = 6 \times 10^7 \text{ U}$$

$$1 \text{ U} = 1 \text{ } \mu\text{mol sustrato convertido} \times \text{min.}^{-1} = 16,67 \text{ nkat}$$

Otra unidad comúnmente usada es la actividad específica, que se refiere a la actividad de una enzima por miligramo (mg) de proteína y se suele expresar en

$\mu\text{mol} / \text{min mg}$ o U/mg . La actividad específica da una idea de la pureza de la enzima (González, 2 004).

1.4.5.2. Ensayos espectrofotométricos

Todos los ensayos enzimáticos miden la cantidad de sustrato consumido o la cantidad de producto generado en la reacción, catalizada por las enzimas, durante un lapso de tiempo. Existen diversos métodos para medir la concentración de sustratos y productos, con el propósito de determinar la actividad enzimática. Entre ellos está el método espectrofotométrico.

En los ensayos espectrofotométricos puede seguirse el curso de una reacción mediante la observación de la cantidad de luz absorbida por la solución, en la que se está dando la reacción. Para poder utilizar un ensayo de este tipo, debe haber entre los sustratos o los productos alguno que absorba luz a una longitud de onda determinada, y que sea la única molécula de la mezcla de reacción que lo hace a esa longitud de onda; de esta forma, se puede observar el aumento o la disminución de la absorbancia con el transcurso del tiempo (Casamayor y González, 2 008).

Es conveniente realizar un ensayo testigo o blanco, que permita determinar el efecto real que tiene sobre el avance de la reacción, la presencia de las moléculas de interés.

Para la medición de la actividad proteolítica, se pueden mencionar dos tipos de ensayos:

a) Ensayos que emplean proteínas como sustratos. Tienen como base el Método de Anson, el cual consiste en cuantificar la cantidad de producto formado por la proteólisis enzimática de un sustrato proteico, como la caseína o la hemoglobina. En esta técnica, se detiene la reacción de hidrólisis, mediante la adición de una solución de ácido tricloroacético (TCA) a la mezcla de reacción, de modo que precipitan tanto el sustrato aun sin degradar, como la enzima, mientras

que los péptidos resultantes se mantienen estables en la solución (Universidad de la Habana, 2 008).

b) Ensayos que emplean sustratos cromogénicos. La acción de las proteasas sobre estos sustratos, produce la hidrólisis del enlace peptídico y genera, entre otros productos de reacción, moléculas coloreadas. Por ejemplo, la hidrólisis de BApNA produce p-nitroanilina, de color amarillo, de modo que se puede seguir espectrofotométricamente el progreso de la reacción mediante la medida del aumento de la absorbancia de la mezcla de reacción con el tiempo, a la longitud de onda de máxima absorción de la p-nitroanilina (Universidad Pablo de Olavide, 2 008).

En la Figura 1.7, se presenta un esquema de la hidrólisis de BApNA, catalizada por papaína, en la que se produce p-nitroanilina.

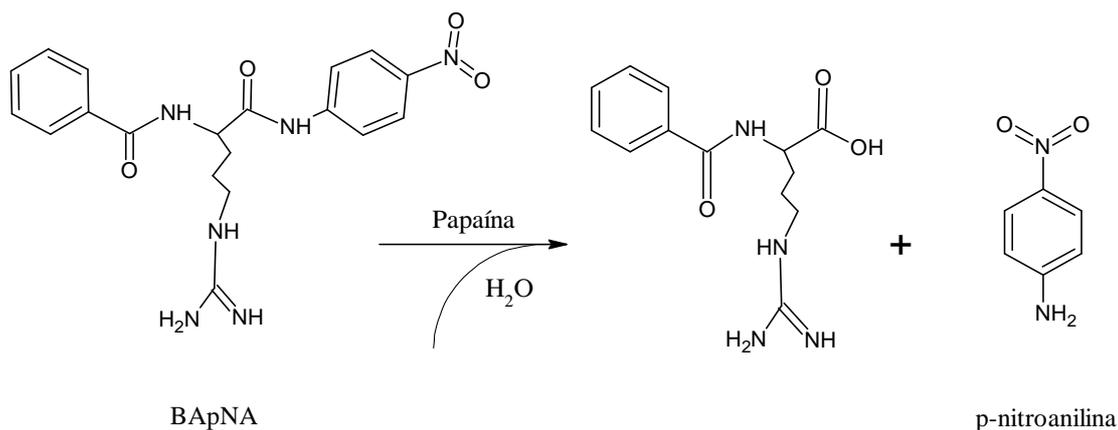


Figura 1.7. Esquema de la reacción de hidrólisis de BApNA, catalizada por papaína (Universidad de Oviedo, 2 008)

1.4.6. EVALUACIÓN DE LOS PROCESOS DE PURIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS

Entre los indicadores que permiten evaluar la efectividad de los procesos de purificación se encuentran la actividad específica, el rendimiento y el grado de purificación.

La actividad específica es la relación entre la actividad enzimática y la cantidad de proteína presente en una muestra, de acuerdo con la Ecuación 1.2.

$$\text{Actividad específica} = \frac{\text{Actividad enzimática}}{\text{Concentración de proteína}} \quad [1.2]$$

El rendimiento es el porcentaje de la actividad enzimática o de la cantidad de proteína que se tiene en cada etapa, con respecto a los valores de estos parámetros al inicio de la purificación. La Ecuación 1.3 expresa el rendimiento en actividad enzimática y la Ecuación 1.4, el rendimiento en concentración proteica.

$$\% \text{ Rendimiento}_A = \frac{\text{Actividad enzimática total (Etapa n)}}{\text{Actividad enzimática total (Etapa 1)}} \cdot 100 \quad [1.3]$$

$$\% \text{ Rendimiento}_P = \frac{\text{Cantidad de proteína (Etapa n)}}{\text{Cantidad de proteína (Etapa 1)}} \cdot 100 \quad [1.4]$$

El grado de purificación relaciona la actividad específica en una etapa del proceso de purificación, con la actividad específica en la primera etapa, para determinar el número de veces que se ha purificado la enzima en estudio. La Ecuación 1.5 expresa esta relación.

$$\text{GP} = \frac{\text{Actividad específica (Etapa n)}}{\text{Actividad específica (Etapa 1)}} \quad [1.5]$$

1.4.7. CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LAS ENZIMAS

Dentro de un estudio enzimático, es importante determinar los parámetros cinéticos K_M y $V_{m\acute{a}x}$, el pH óptimo y la temperatura óptima, con el fin de establecer las condiciones en las que la actividad de una enzima puede llegar a su valor máximo.

1.4.7.1. Cinética de Michaelis y Menten

Leonor Michaelis y Maud Menten propusieron un modelo para explicar la mayoría de las reacciones catalizadas por enzimas, de acuerdo con el cual, la enzima (E) se combina reversiblemente con su sustrato (S), para formar el complejo enzima-sustrato (ES), que luego se rompe para formar irreversiblemente el producto (P) y regenerar la enzima. El esquema de este modelo se muestra a continuación:



En esta expresión k_1 , k_2 y k_3 son las constantes de velocidad de reacción. Se supone que la reacción enzimática es irreversible y que el producto se separa de la enzima después de la reacción.

De acuerdo con la aproximación del estado estacionario, que señala que la concentración del complejo enzima-sustrato (ES) es pequeña y se mantiene casi constante a lo largo de la reacción enzimática; que la concentración total de enzima es la sumatoria de la concentración de enzima libre más la concentración del complejo (ES), y que la conversión de reactivos a productos se da con una reacción de primer orden (Boyer, 2 000), se obtiene la Ecuación 1.7:

$$V_o = \frac{V_{\text{máx}} \cdot [S]}{[S] + K_M} \quad [1.7]$$

Donde:

V_o es la velocidad de reacción catalizada enzimáticamente, en U/ml.

$V_{\text{máx}}$ es la velocidad máxima de reacción.

$[S]$ es la concentración de sustrato, en mM.

K_M es la constante de Michaelis y Menten, en mM.

En la ecuación se incluyen dos parámetros que describen las propiedades de la enzima:

- La velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$), que es el valor límite de la velocidad de reacción a una muy elevada concentración de sustrato.
- La constante de Michaelis y Menten (K_M), que es la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima. Una alta afinidad de la enzima por el sustrato genera valores bajos de K_M y viceversa.

En la Figura 1.8, se muestra el gráfico de la curva hiperbólica V_o vs. $[S]$, a partir de la ecuación de Michaelis y Menten y los parámetros K_M y $V_{m\acute{a}x}$:

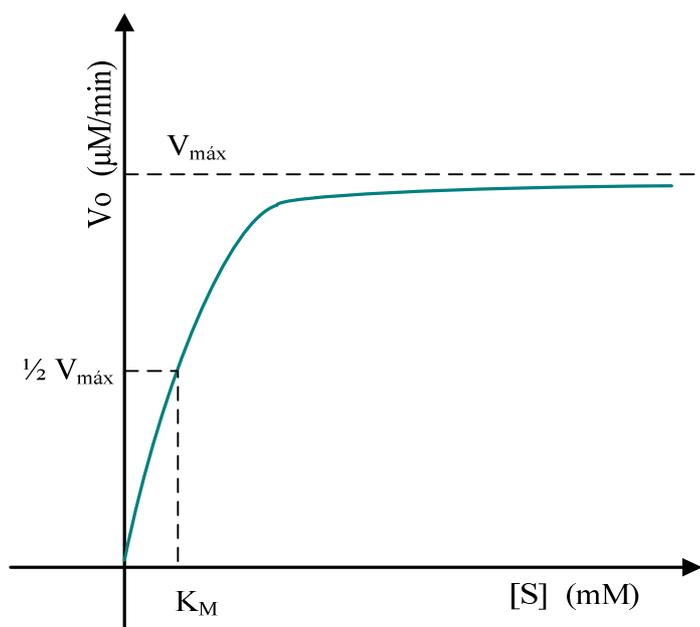


Figura 1.8. Esquema de la curva hiperbólica cuadrática correspondiente al modelo de Michaelis - Menten
(Universidad Nacional de Costa Rica, 2 007)

El diagrama de Lineweaver - Burk se emplea como herramienta gráfica para calcular los parámetros cinéticos de una enzima. Su utilidad consiste en que el recíproco de la cinética de Michaelis-Menten es fácilmente representable y que de él se puede obtener información de interés.

La gráfica del inverso de la velocidad de reacción ($1/V_o$) frente al inverso de la concentración de sustrato ($1/[S]$) permite identificar K_M y $V_{m\acute{a}x}$; el punto de corte con el eje de ordenadas es el equivalente a $1/V_{m\acute{a}x}$, y con el de abscisas es el valor de $-1/K_M$. Además se utiliza este método para determinar el mecanismo de acción de los diversos tipos de inhibidores (Boyer, 2 000).

La Ecuación 1.8 describe el diagrama de Lineweaver - Burk:

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad [1.8]$$

En la Figura 1.9, se esquematiza el gráfico de $1/V$ vs. $1/[S]$, según la ecuación de Lineweaver-Burk:

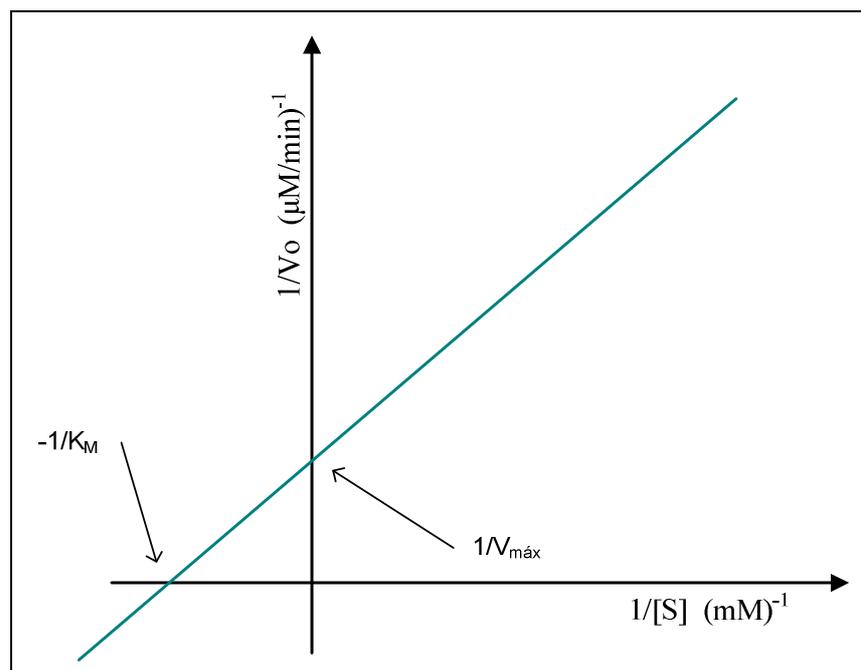


Figura 1.9. Esquema de la gráfica correspondiente al Modelo de Lineweaver-Burk para determinar K_M y $V_{m\acute{a}x}$ (Diberri, 2 004)

1.4.7.2. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática

Al medir la velocidad inicial de una reacción enzimática, con una cantidad constante de enzima, a diferentes concentraciones de sustrato, se obtienen los datos para construir la curva de Michaelis y Menten. Este gráfico muestra que la velocidad de reacción varía en función de la concentración de sustrato.

En la Figura 1.8, presentada en el acápite 1.4.7.1, se puede observar que, al incrementar la concentración del sustrato, la velocidad de reacción aumenta hasta un valor máximo. En la parte inicial de la curva, prácticamente, V_o es directamente proporcional a $[S]$; mientras que, cuando la curva se vuelve asintótica, la enzima está saturada con el sustrato y V_o llega al valor de $V_{m\acute{a}x}$.

Se debe resaltar que la presencia de producto en el medio, puede ocasionar que la velocidad de reacción sea más lenta e incluso invertir su sentido, por lo cual, se favorecería la formación de sustrato.

Finalmente, cuando se conoce el valor de $V_{m\acute{a}x}$, se puede calcular la constante conocida como el número de recambio de una enzima (Boyer, 2 000); que es el número de moles de sustrato transformado por moles de enzima, en un tiempo determinado, de acuerdo con la Ecuación 1.9.

$$k_3 = \frac{V_{m\acute{a}x}}{[E_T]} \quad [1.9]$$

Donde:

$[E_T]$ es la concentración total de enzima.

1.4.7.3. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

En general, los aumentos de temperatura aceleran las reacciones químicas. Las reacciones catalizadas por enzimas siguen esta ley general. Sin embargo, al

tener una estructura proteica, a partir de cierta temperatura, las enzimas se empiezan a desnaturalizar por el calor.

La temperatura a la cual la actividad catalítica es máxima se llama temperatura óptima. Por encima de esta temperatura, el aumento de velocidad de la reacción debido a la temperatura es contrarrestado por la pérdida de actividad catalítica debida a la desnaturalización térmica y la actividad enzimática decrece rápidamente hasta anularse (González, 2 004).

Generalmente, la curva de actividad enzimática contra la temperatura es asimétrica y presenta un valor de temperatura en el que la actividad alcanza un punto máximo. La Figura 1.10 muestra este comportamiento:

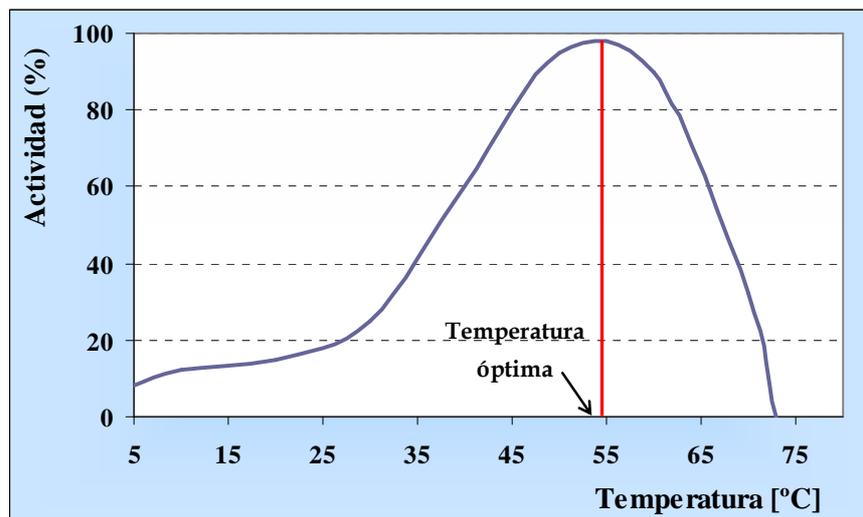


Figura 1.10. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

1.4.7.4. Efecto del pH sobre la actividad enzimática

Las enzimas poseen grupos químicos ionizables (carboxilo $-\text{COOH}$; amino $-\text{NH}_2$; tiol $-\text{SH}$; etc.) en las cadenas laterales de sus aminoácidos. Según el pH del medio, estos grupos pueden tener carga eléctrica positiva, negativa o neutra. Como la conformación de las proteínas depende, en parte, de sus cargas eléctricas, existe un pH en el cual la conformación es la más adecuada para la actividad catalítica. Este es el pH óptimo.

La mayoría de las enzimas son muy sensibles a los cambios de pH. Desviaciones por encima o por debajo del pH óptimo pueden afectar drásticamente su actividad o incluso desnaturalizarlas; de modo que, con el objetivo de mantener el pH de un sistema que contiene enzimas en un rango cercano a su valor óptimo, se deben utilizar soluciones tampones o amortiguadores fisiológicos (González, 2 004).

Diferentes enzimas presentan diferentes comportamientos en la curva de la actividad enzimática contra el pH. Así, enzimas como la pepsina, tienen un máximo de actividad a pH ácidos; mientras que, otras enzimas pueden presentar una actividad estable en amplios rangos de pH. La Figura 1.12 representa el comportamiento de la actividad de una enzima con un pH óptimo de 7.

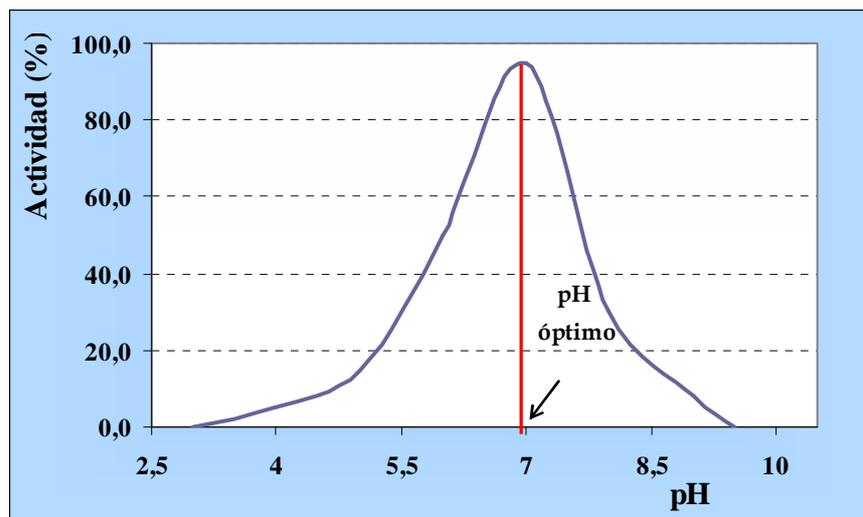


Figura 1.11. Esquema del efecto del pH sobre la actividad enzimática

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

2.1.1. MATERIALES

Para el desarrollo de la presente investigación se utilizaron los siguientes materiales: frutos verdes de plantas del género *Vasconcella*; agua desionizada; celdas de cuarzo para espectrofotometría; columna de vidrio de 1 m de longitud con sus respectivos pistones; columna de polietileno de 34 cm de longitud con sus respectivos pistones y, micropipetas ajustables de 5 a 50 μl y de 200 a 1 000 μl .

2.1.2. REACTIVOS

- Ácido clorhídrico (BDGH Chemical, U.K.), grado analítico.
- Alcohol etílico absoluto (J. T. Baker, U.S.A.), grado analítico.
- Hidrocloruro de N- α Benzoil L-arginina p-nitroanilida – BApNA, (SIGMA), grado analítico.
- Cloruro de sodio (Baker Analyzed, U.S.A.), 100% puro.
- DEAE sepharosa CL-6B (Farmacia, Suecia).
- Dimetil formamida (Riedel Seelze, Germany), grado analítico.
- Fosfato diácido de sodio dihidratado (BDGH Chemical, U.K.), 99,8% de pureza.
- Hidróxido de sodio ACS (J.T. Baker, U.K.), 99% de pureza.
- Sepharosa CL-6B (SIGMA, U.S.A.).

2.1.3. EQUIPOS

- Balanza analítica (Acculab LH 110, Alemania). De 110 g x 0,0001g
- Centrífuga 200 E swing out rotor (WIFUG).
- Centrífuga IEC HN-S (DAMON).
- Conductímetro Sension 7 (HACH).
- Espectrofotómetro UV-visible (Shimadzu, Japón).
- pHmetro portátil (Schott Glaswerke Mainz, Alemania).
- Sistema de separación por cromatografía de columna (PHARMACIA LKB / GILSON).

2.2. MÉTODOS

2.2.1. PRUEBAS PRELIMINARES CON LÁTEX DE FRUTOS DE BABACO (*Vasconcella* × *heilbornii* var. babaco) Y DE CHAMBURO (*Vasconcella cundinamarcensis*)

Para la realización de las pruebas preliminares, se utilizaron frutos verdes de babaco (*Vasconcella* × *heilbornii* var. babaco) y de chamburo (*Vasconcella cundinamarcensis*), recolectados en Quito, en el sector de Chillogallo.

En el laboratorio, se lavaron los frutos y se hicieron de 3 a 5 cortes longitudinales en la superficie de los mismos, para obtener el látex. Se recolectaron, por separado, los látex fluidos que cayeron en forma de gotas de cada fruto (látex fluido) y los látex que se coagularon (látex coagulado).

A continuación, se procedió al secado de los látex en estufa. Un grupo de muestras de látex fue secado a 40° C (Gómez, 2 008) y otro grupo a 55° C (Scheldeman y otros, 2003), durante aproximadamente 24 horas.

Con los látex en polvo obtenidos, se prepararon extractos acuosos, de acuerdo al procedimiento que se describe en la sección 2.2.5 y se midió la concentración

proteica y la actividad caseinolítica de cada extracto, mediante los procedimientos descritos en los acápites 2.2.6 y 2.2.7.1, respectivamente.

Se utilizó el programa Microcal Origin 5.0 para determinar si existieron diferencias estadísticas significativas entre los valores de actividad caseinolítica de los látex fluidos, con respecto a los de los látex coagulados y, entre los valores de actividad de los látex secados a 40° C, con respecto a los de los látex secados a 55° C. En cada caso se trabajó con 4 repeticiones.

Adicionalmente, para determinar si el almacenamiento en congelación de los látex secos permitía una adecuada conservación de su actividad, se comparó la actividad caseinolítica de los extractos acuosos preparados inicialmente, con la actividad de otro grupo de extractos, que se prepararon según el mismo procedimiento con dichos látex, luego de que estuvieron almacenados durante tres semanas.

2.2.2. SELECCIÓN DE TRES ESPECIES REPRESENTATIVAS DEL GÉNERO

Vasconcella

Se realizó una revisión bibliográfica acerca del género *Vasconcella*, con el fin de determinar las características botánicas de las plantas de este género; las especies que han sido encontradas en el Ecuador; los lugares en los que se han encontrado plantas pertenecientes a dichas especies, los nombres con los que se les conocen y la información referente a la actividad proteolítica presente en el látex de sus frutos.

Además, se visitaron los lugares mencionados, con el fin de comprobar la presencia de plantas del género *Vasconcella*, a las cuales se podía acceder para recolectar sus frutos verdes.

2.2.3. RECOLECCIÓN Y TRATAMIENTO DE LOS FRUTOS

La recolección de los frutos pertenecientes a las tres especies del género *Vasconcella* seleccionadas, se realizó en zonas aledañas a la ciudad de Loja. La identificación de las plantas fue realizada con ayuda del Ing. Nixon Cumbicus, quien es investigador de la Unidad de Botánica y Etnobotánica, de la Universidad Técnica Particular de Loja.

Se utilizaron guantes de nitrilo, con el fin de evitar el contacto de la piel con el látex que la planta exuda al retirar los frutos. Se tomaron de 6 a 8 frutos de una misma planta. Los frutos fueron envueltos en papel aluminio, colocados en fundas plásticas y transportados al laboratorio.

En el laboratorio, se seleccionaron los frutos verdes que presentaban una mejor apariencia y se hizo un lavado con agua, una desinfección con una solución de etanol al 5% y un enjuague con agua destilada.

2.2.4. OBTENCIÓN Y SECADO DEL LÁTEX

Se colocaron los frutos, agrupados por especie, en posición vertical y se realizaron 3 cortes longitudinales, de aproximadamente 2 mm de profundidad, en su superficie. Se recolectó, en cajas Petri, el látex exudado que cayó en forma de gotas, para su secado.

El látex fue secado a 40° C, durante aproximadamente 24 horas, hasta que el peso del mismo se mantuvo constante durante 15 segundos, en la balanza analítica (Núñez, 2 008).

A continuación, se removió el látex seco de las cajas Petri y se colocó en tubos Eppendorf para su almacenamiento en congelación (Montiel, 2 005).

En la Figura 2.1, se presenta un diagrama de bloques para la obtención del látex seco, a partir de los frutos verdes, agrupados según su especie.

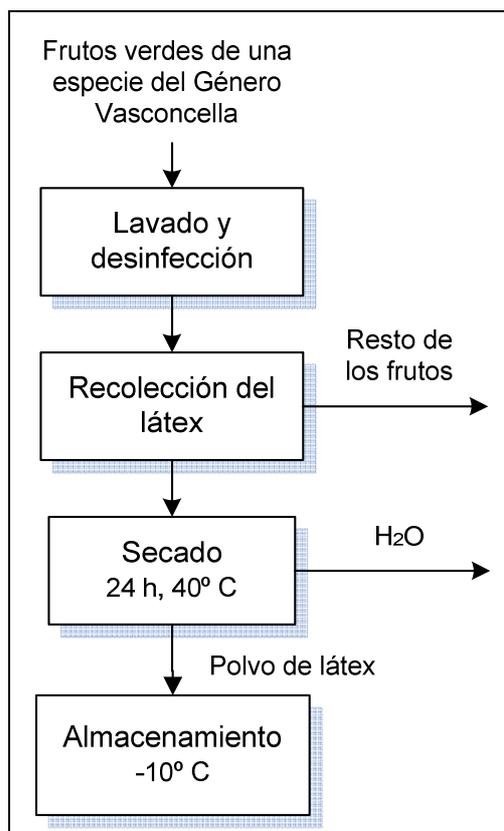


Figura 2.1. Diagrama del proceso para la obtención de látex seco en plantas del género *Vasconcella*

2.2.5. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS ACUOSOS A PARTIR DEL LÁTEX SECO

Para la preparación del extracto acuoso de 5 mg/ml a partir del látex seco obtenido en la etapa anterior, se colocaron 55 mg de látex seco en un mortero y se redujo su tamaño lentamente, con el fin de evitar un aumento de temperatura a causa de la fricción.

A continuación, se colocaron 50 mg del polvo de látex en un matraz de 10ml y se añadió tampón fosfato 50 mM y pH 7,5 hasta aforarlo. Se colocó el matraz en refrigeración durante 24 horas, para la solubilización de las proteínas. Posteriormente, se centrifugó la suspensión a 2 700 x g, durante 10 minutos. Se tomó el sobrenadante con una pipeta y se colocó en un tubo de vidrio. Se

prepararon tres extractos acuosos, uno por cada muestra de látex seco. En la Figura 2.2, se presenta un diagrama de bloques de este proceso.

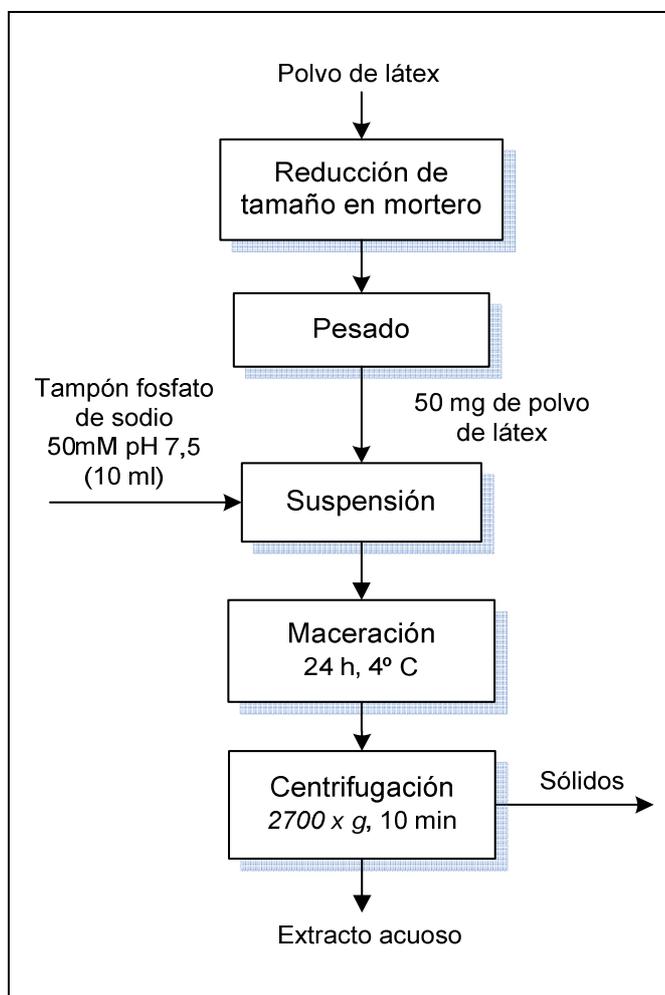


Figura 2.2. Diagrama del proceso para la preparación de extractos acuosos a partir de polvo de látex

2.2.6. DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA EN LOS EXTRACTOS OBTENIDOS

Para la determinación de la concentración proteica en los extractos acuosos, se utilizó el método de absorción en el ultravioleta (Yáñez, 2 006). Cuando las lecturas de la densidad óptica de las muestras estuvieron sobre el valor de 1,000, se realizaron diluciones de las mismas con la solución tampón, en relaciones 1 a 5 ml y 1 a 10 ml.

La Ecuación 2.1 fue utilizada para calcular la concentración de proteína.

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

Donde:

[P] es la concentración de proteína soluble, en mg/ml.

DO_{280} es la densidad óptica medida a 280 nm.

f es el factor de dilución.

L es la longitud del paso de la luz en la celda, en cm.

ε es el coeficiente de extinción de la enzima a 280 nm, cuyo valor se considera igual a $1,0 \text{ (mg/ml)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.2.7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LOS EXTRACTOS OBTENIDOS

2.2.7.1. Determinación de la actividad caseinolítica

La actividad caseinolítica fue determinada mediante el método de Anson modificado (Bastidas, 2 005). Por cada extracto acuoso, se prepararon dos muestras y dos blancos, debido a que se realizó un ensayo en paralelo (Félix, 2 008).

Se colocaron 0,1 ml de extracto acuoso en cada tubo de ensayo. En los tubos correspondientes a las muestras, se añadieron 1,1 ml de solución de caseína al 1,0%; mientras que, en los tubos correspondientes a los blancos, se vertieron 1,8 ml de una solución al 5% de de ácido tricloroacético (TCA) y luego se añadieron 1,1 ml de caseína.

Todos los tubos fueron incubados en un baño termostático a 37° C, durante 20 minutos. A continuación, se procedió a detener la reacción en los tubos correspondientes a las muestras, adicionando 1,8 ml de TCA.

Antes de la lectura de la densidad óptica, a 280 nm, de todas las muestras y blancos, fue necesario realizar una centrifugación a 3 500 x g, por 20 minutos y recuperar el sobrenadante en tubos de vidrio.

En las Figuras 2.3 y 2.4, se muestran los diagramas de los procesos seguidos en la preparación de los blancos y de las muestras, respectivamente, para la determinación de la actividad caseinolítica de los extractos acuosos.

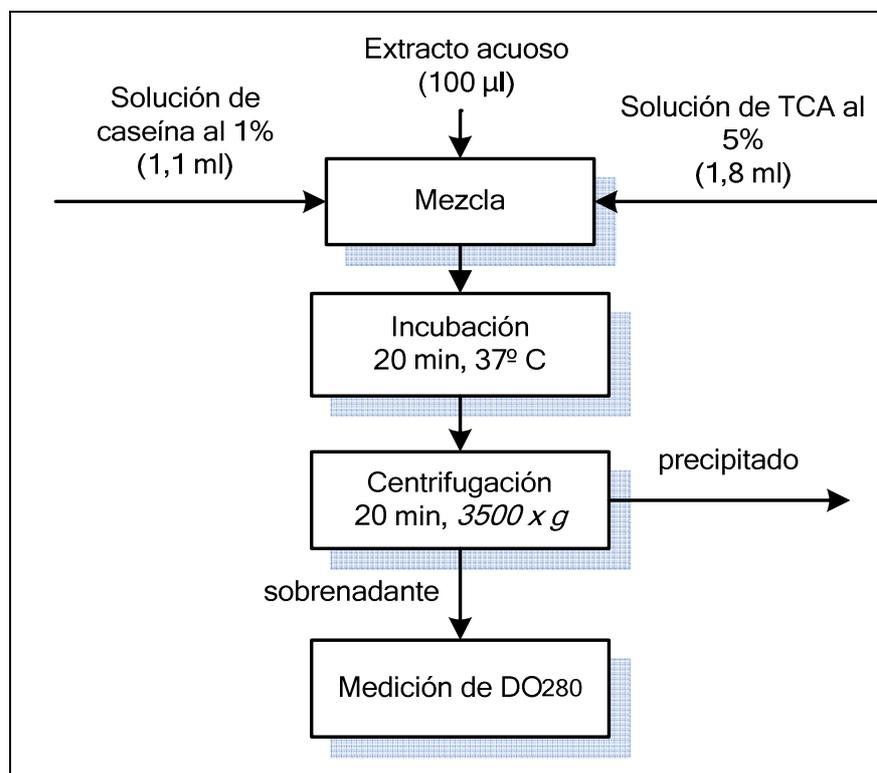


Figura 2.3. Diagrama de procesos para la determinación de la actividad caseinolítica de los blancos

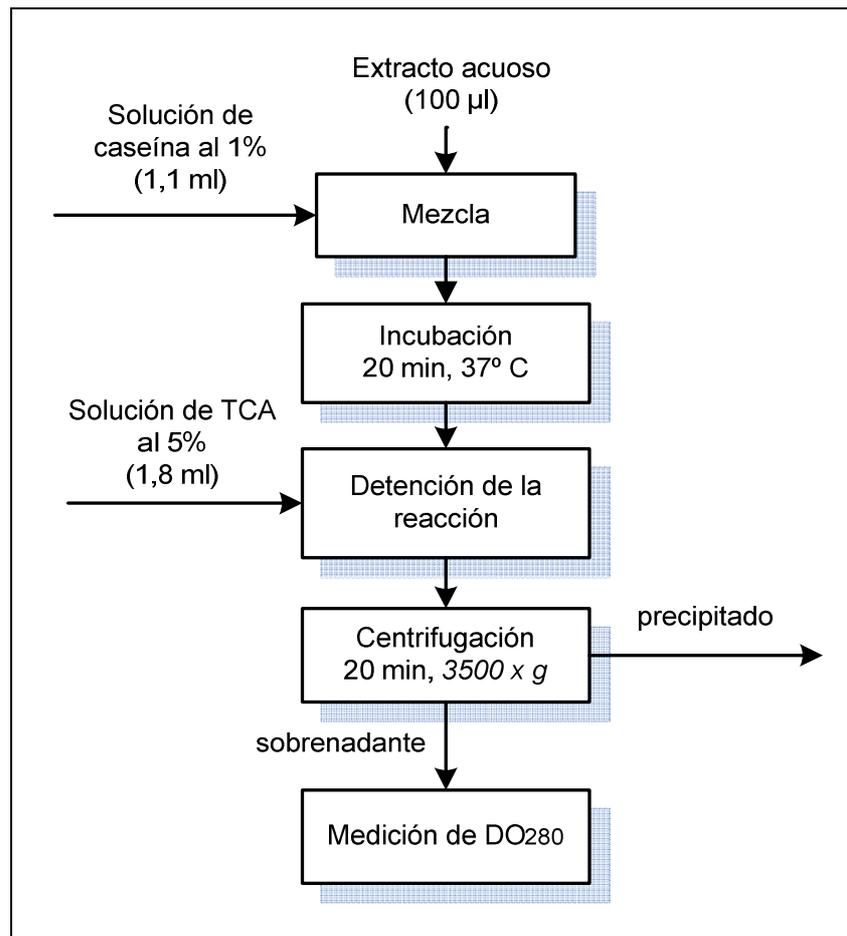


Figura 2.4. Diagrama de procesos para la determinación de la actividad caseinolítica de los extractos acuosos

Para el cálculo de la actividad caseinolítica, se utilizó la Ecuación 2.2 (Caramori y otros, 2 004).

$$A_C = \frac{h}{(0,1)^2} \quad [2.2]$$

Donde:

A_C es la actividad caseinolítica, en unidades enzimáticas por ml de solución de enzima (U/ml).

h es el promedio de las variaciones de DO_{280} , obtenida en cada ensayo, en paralelo.

2.2.7.2. Determinación de la actividad esterásica

La mezcla de reacción para la determinación de la actividad esterásica, fue realizada en una celda de cuarzo para espectrofotómetro. Se colocaron 2,5 ml de tampón fosfato de sodio 50 mM y pH 7,5 y se añadieron 30 μ l de extracto acuoso y 30 μ l de una solución de acetato de para – nitro fenilo (p-NPA), con una concentración de 15 mg/ml, en acetonitrilo anhidro.

A continuación, se agitó la mezcla y se procedió a realizar la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 348 nm. Se registraron los valores de la densidad óptica cada 15 segundos, durante tres minutos (Félix, 2 008).

Para determinar la actividad del blanco, se realizó el ensayo de una forma similar, con la diferencia de que se colocaron 30 μ l de tampón fosfato de sodio 50 mM y pH 7,5, en lugar del extracto acuoso.

Las Figuras 2.5 y 2.6 muestran los diagramas de los procesos que se siguieron para la determinación de la actividad proteolítica del extracto enzimático y de la hidrólisis espontánea del blanco.

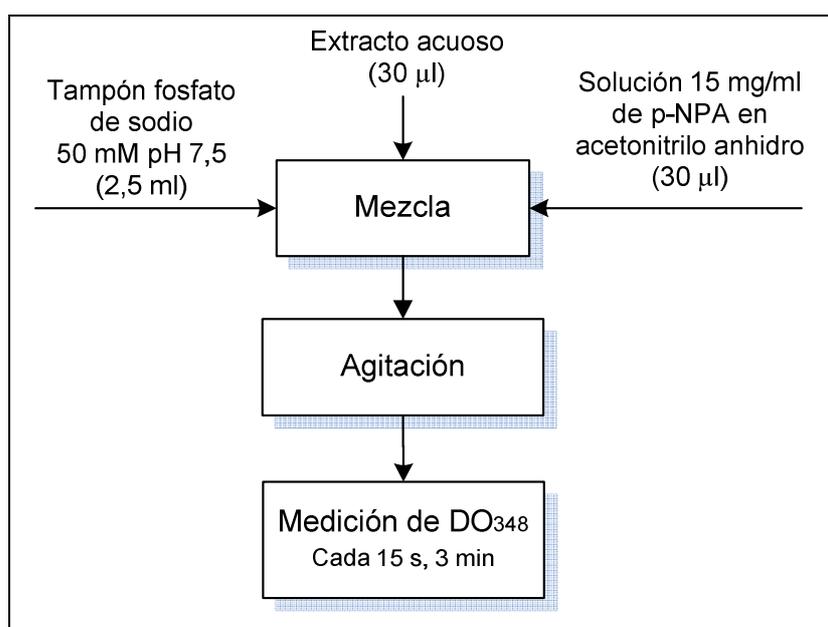


Figura 2.5. Diagrama de procesos para la determinación de la actividad esterásica de los extractos acuosos

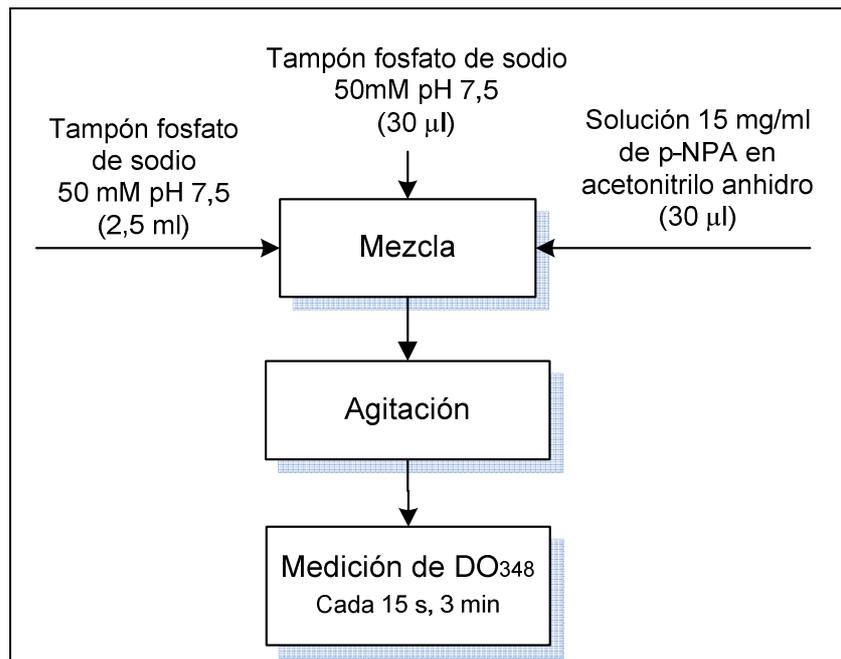


Figura 2.6. Diagrama de procesos para la determinación de la actividad esterásica de los blancos

Se determinó la actividad esterásica en unidades enzimáticas por mililitro de solución de enzima (U/ml), a través de la Ecuación 2.3 (Reina, 2 000).

$$A_E = \frac{\Delta DO_{348}}{\Delta t} \cdot \frac{1000 \cdot V_c}{\varepsilon \cdot L \cdot V_e} \quad [2.3]$$

Donde:

A_E es la actividad esterásica, en unidades internacionales por ml de solución de enzima, en U/ml.

ΔDO_{348} es la diferencia entre la DO de la mezcla de reacción con el extracto enzimático y la DO de la mezcla para la hidrólisis espontánea.

Δt es el tiempo en el que se mide el avance de la reacción, en min.

V_c es el volumen de la mezcla de reacción, en µl.

V_e es el volumen del extracto acuoso en la mezcla de reacción, en µl.

1 000 es el factor de conversión de mmol/ml a µmol/ml.

L es la longitud del paso de luz en la celda, en cm.

ε es el coeficiente de extinción del p-nitrofenol a 348 nm = $5\,150\, M^{-1}\, cm^{-1}$.

2.2.7.3. Determinación de la actividad proteolítica con BApNA

Para la determinación de la actividad proteolítica con BApNA (N- α -benzoil-DL-arginina- ρ -nitroanilida), se realizó una mezcla de reacción en una celda de cuarzo de volumen reducido, para espectrofotómetro, de acuerdo con el método de Earlander *et al.* (1961) modificado por el autor. Se colocó 1,0 ml de tampón fosfato de sodio 50 mM y pH 7,5 y se añadieron 0,1 ml de extracto acuoso y 0,1 ml de una solución de BApNA, con una concentración de 10 mg/ml, en dimetil formamida (DMF).

A continuación, se agitó suavemente la mezcla y se colocó la celda en el espectrofotómetro, para realizar la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 400 nm. Se registraron los valores de la densidad óptica, cada 15 segundos, durante tres minutos.

Para determinar la actividad del blanco, en la mezcla de reacción se colocaron 0,1 ml de tampón fosfato de sodio 50 mM y pH 7,5, en lugar del extracto acuoso.

Las Figuras 2.7 y 2.8 muestran los diagramas de los procesos que se siguieron para la determinación de la actividad proteolítica del extracto enzimático y de la hidrólisis espontánea del blanco.

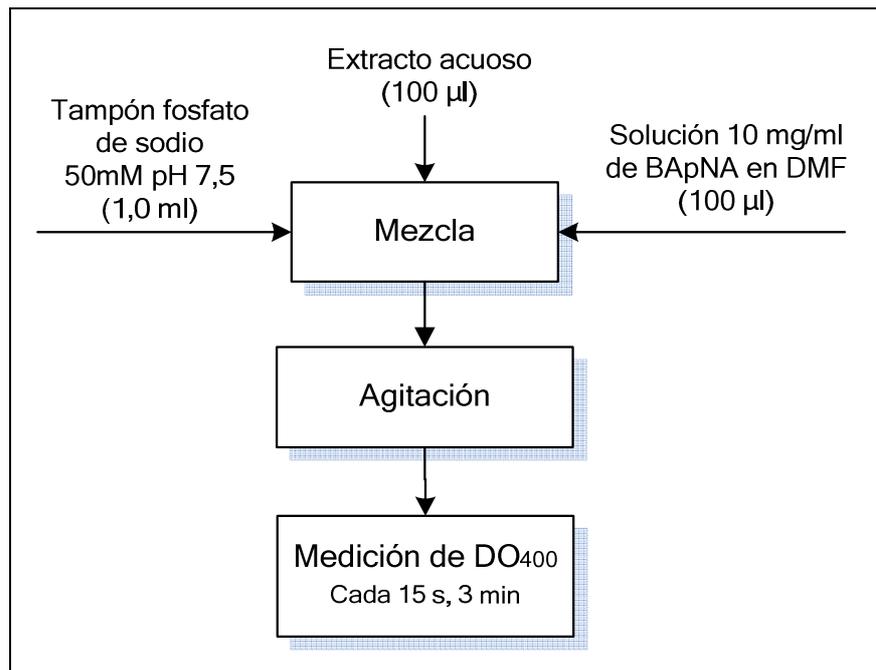


Figura 2.7. Diagrama de procesos para la determinación de la actividad proteolítica con BApNA de los extractos acuosos

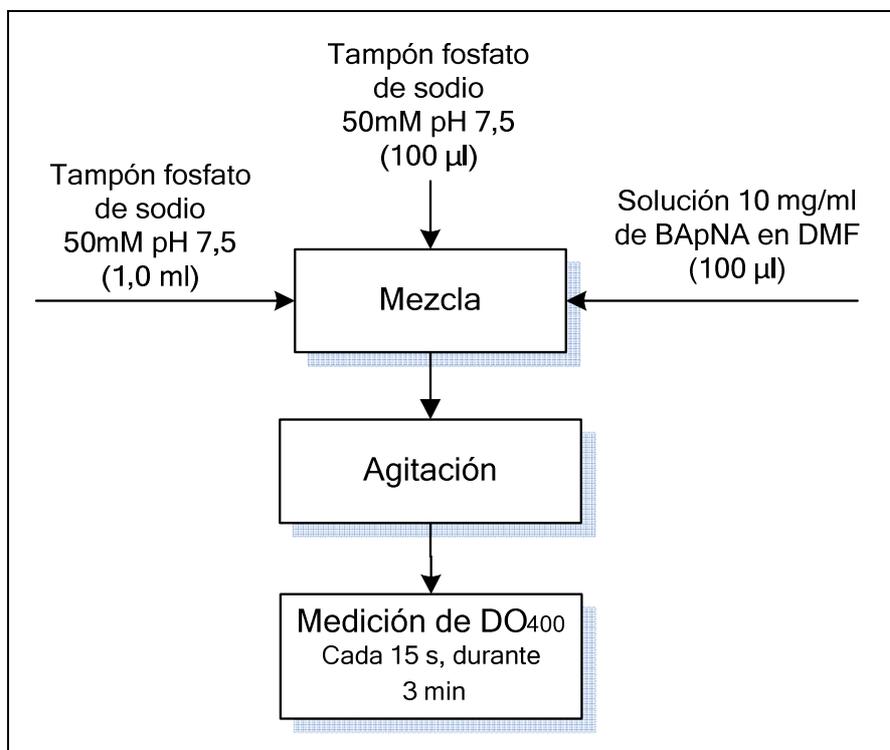


Figura 2.8. Diagrama de procesos para la preparación de la muestra en la determinación de la actividad proteolítica con BApNA

Se determinó la actividad proteolítica con BApNA, en unidades enzimáticas por mililitro de solución de enzima (U/ml), a través de la Ecuación 2.4 (Reina, 2000).

$$A_B = \frac{\Delta DO_{400}}{\Delta t} \cdot \frac{1000 \cdot V_c}{\epsilon \cdot L \cdot V_e} \quad [2.4]$$

Donde:

A_B es la actividad proteolítica con BApNA, en unidades internacionales por ml de solución de enzima, en U/ml.

ΔDO_{400} es la diferencia entre la DO de la mezcla de reacción con el extracto enzimático y la DO de la mezcla para la hidrólisis espontánea.

Δt es el tiempo en el que se mide el avance de la reacción, en min.

V_c es el volumen de la mezcla de reacción, en μl .

V_e es el volumen del extracto acuoso colocado en la mezcla de reacción, en μl .

ϵ es el coeficiente de extinción de la p -nitroanilina a 400 nm = 8 800 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Earlanger y otros, 1 961).

1 000 es el factor de conversión de mmol/ml a $\mu\text{mol/ml}$.

L es la longitud del paso de luz en la celda, en cm.

2.2.7.4. Cálculo de la actividad enzimática específica

El cálculo de la actividad enzimática específica se realizó mediante la Ecuación 2.5 (Chávez y otros, 1 990), que define la actividad enzimática por cantidad de proteína presente en el extracto.

$$A_{\text{esp}} = \frac{AE}{[P]} \quad [2.5]$$

Donde:

A_{esp} es la actividad específica, en unidades internacionales por mg de proteína (U/mg).

AE es la actividad enzimática, en U/ml.

[P] es la concentración de proteína, en mg/ml.

2.2.8. PRECIPITACIÓN DE LAS PROTEÍNAS PRESENTES EN LOS EXTRAC- TOS ACUOSOS

Se realizó una precipitación de las proteínas por adición de solvente orgánico. Para esto, se colocaron 20 ml de extracto acuoso en un vaso de precipitación, se añadió 1 ml de una solución de cloruro de sodio 4 M, se agitó la mezcla y se agregaron 40 ml de una solución de etanol al 96% en volumen. Posteriormente, se realizó una agitación leve y se distribuyó la mezcla en 4 tubos plásticos para centrifugar a $2\ 700 \times g$, durante 5 minutos.

En seguida, se desechó el sobrenadante y se colocaron los tubos hacia abajo, sobre una toalla de papel absorbente, durante aproximadamente 30 minutos, hasta que el precipitado se presentó semiseco.

A continuación, se resuspendió el precipitado en 40 ml de tampón fosfato de sodio 50 mM a pH 7,5, para obtener un extracto semipurificado. La Figura 2.9 presenta el diagrama del proceso de purificación del extracto acuoso, por adición de etanol al 96%.

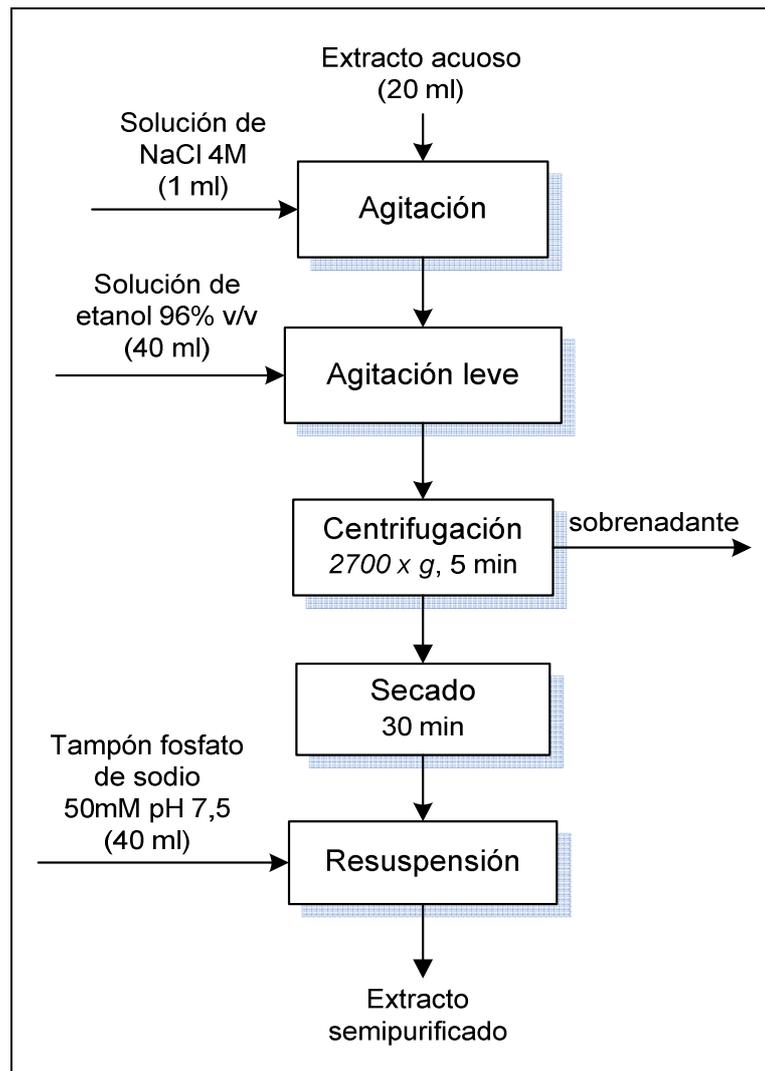


Figura 2.9. Diagrama del proceso de precipitación y resuspensión de proteínas a partir del extracto acuoso

2.2.9. PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO MÁS ACTIVO POR CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN EN GEL

Se realizó una cromatografía de filtración en gel, con el extracto semipurificado que presentó la mayor actividad enzimática específica. Se utilizó una columna de vidrio, de 1 m de longitud, con un relleno de Sepharosa CL-6B.

2.2.9.1. Lavado y relleno de la columna

Se tomaron aproximadamente 100 ml de Sepharosa CL-6B y se eliminó la solución de etanol en la que el gel se mantiene conservado, con ayuda de una frita y una bomba de succión.

Se resuspendió el gel en agua destilada y se agitó durante 10 minutos, luego, se colocó el gel nuevamente en la frita para realizar tres lavados con agua destilada y con la solución tampón fosfato 50 mM y pH 7,5. Al final, se dejó el gel suspendido en el tampón.

Se empacó la suspensión preparada en la columna, hasta 5 cm antes del extremo superior y se colocó el segundo pistón (Félix, 2 008).

Finalmente, se lavó el sistema con el mismo tampón, en una cantidad igual a tres veces el volumen ocupado por el relleno.

2.2.9.2. Alimentación y elución de la muestra

Se fijaron las condiciones para la cromatografía de filtración en gel, en los valores que se muestran en la Tabla 2.1 (Félix, 2 008).

Tabla 2.1. Condiciones de operación del detector, el colector de fracciones y el registrador para la cromatografía de filtración en gel

Altura del relleno de Sepharosa CL-6B	86 cm
Flujo de alimentación	1,0 ml/min
Tiempo por fracción	3,00 min
Ganancia	0,2
Sensibilidad	100 mV
Velocidad del papel	1 mm/min

Entonces, con ayuda de la bomba peristáltica, se alimentaron a la columna 30 ml del extracto semipurificado, obtenido después de la precipitación. Enseguida, se

alimentó tampón fosfato 50 mM a pH 7,5 al sistema, hasta que ya no se detectó proteína a la salida del mismo.

2.2.10. PURIFICACIÓN DEL LOTE DE FRACCIONES MÁS ACTIVAS POR CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

Para la purificación por cromatografía de intercambio iónico, se utilizó una columna, de 34 cm de longitud, con un relleno de DEAE Sepharosa CL-6B. La muestra consistió en una mezcla de las fracciones más activas, resultantes de la cromatografía de filtración en gel.

2.2.10.1. Preparación de la columna de intercambio iónico

Se tomaron aproximadamente 50 ml del gel de DEAE Sepharosa CL-6B y se eliminó el líquido del mismo por filtración en una frita. Posteriormente, se lavó el soporte con soluciones de tampón fosfato a pH 7,5, en concentraciones de 1 000, 500, 200 y 50 mM, sucesivamente, en la misma frita. En el último lavado, se dejó el soporte en suspensión con tampón fosfato 50 mM y pH 7,5 y se empacó la columna, hasta una altura de 20 cm (Bastidas, 2 005).

Finalmente, se procedió a lavar el sistema con tampón fosfato 50 mM y pH 7,5, durante aproximadamente 30 minutos.

2.2.10.2. Alimentación de la muestra

Se midió la conductividad del tampón fosfato 50 mM y pH 7,5, tomado a la salida de la columna, luego del lavado. Entonces, se procedió a igualar con ese valor, la conductividad de la muestra, mediante la adición de agua desionizada.

A continuación, se alimentó la muestra preparada a la columna, con ayuda de una bomba peristáltica y se lavó la columna con el tampón fosfato 50 mM y pH 7,5, hasta que a la salida de la columna ya no se detectó proteína (Bastidas, 2 005).

2.2.10.3. Elución de la proteína fijada al soporte

Se realizó una elución por gradiente de la proteína fijada al soporte. Para esto, se colocaron, en el mezclador de gradiente, como solución inicial 50 ml de tampón fosfato 50 mM y pH 7,5 y como solución final, 50 ml de tampón fosfato 200 mM y pH 7,5. Luego, se colocaron 50 ml de tampón fosfato 200 mM y pH 7,5 como solución inicial y 50 ml de tampón fosfato 500 mM y pH 7,5 como solución final. Por último, se realizó un lavado con tampón fosfato 500 mM y 1 M, y pH 7,5.

Se recogieron todos los eluatos en un colector de fracciones y se determinó la concentración proteica y la actividad proteolítica en cada uno de ellos.

En la Tabla 2.2 se detallan las condiciones en las que se realizó la cromatografía de intercambio iónico (Bastidas, 2 005).

Tabla 2.2. Condiciones de operación del detector, el colector de fracciones y el registrador para la cromatografía de intercambio iónico.

Altura del relleno de DEAE Sepharosa CL-6B	22 cm
Flujo de alimentación	1,0 ml/min
Tiempo por fracción	3,0 min
Ganancia	0,2
Sensibilidad	100 mV
Velocidad del papel	1 mm/min

2.2.11. EVALUACIÓN DE LOS PROCESOS DE PURIFICACIÓN

Se evaluaron los tres procesos de purificación (la precipitación de proteínas, la cromatografía de filtración en gel y la cromatografía de intercambio iónico) mediante el cálculo del rendimiento en proteína, el rendimiento en actividad y el grado de purificación, de acuerdo con las Ecuaciones 1.3, 1.4 y 1.5.

Para esto, fue necesario determinar el contenido de proteína y de unidades enzimáticas en el extracto acuoso, en el extracto semipurificado y en las fracciones resultantes de las cromatografías de filtración en gel y de intercambio iónico.

Con el fin de tener un parámetro de comparación entre los procesos de purificación, los rendimientos y el grado de purificación de cada etapa fueron calculados con respecto a la etapa anterior, mientras que, para evaluar el proceso completo de purificación, se determinaron dichos valores, con respecto a la etapa inicial de todo el proceso. En el Anexo E, se muestran ejemplos de cálculo de los parámetros mencionados.

2.2.12. DETERMINACIÓN DE LOS EFECTOS DEL pH, LA TEMPERATURA Y LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO, SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EN LA FRACCIÓN MÁS ACTIVA

Al final del proceso de purificación, se seleccionó la fracción más activa y con ella se realizó la caracterización de su actividad proteolítica.

2.2.12.1. Determinación del efecto del pH sobre la actividad proteolítica

Se prepararon soluciones tampón fosfato de sodio 50 mM a valores de pH de 5,5; 6,5; 7,0; 7,5; 8,5; 9,5 y 10,5.

A continuación, se determinó espectrofotométricamente la actividad proteolítica con BApNA para cada valor de pH, de manera igual al procedimiento esquematizado en la Figura 2.5, con una mezcla de reacción de 1 ml de solución tampón, 100 µl de la fracción seleccionada y 100 µl de sustrato.

Finalmente, se realizó la gráfica de actividad enzimática (U/ml) contra pH y se determinó el pH óptimo, en el programa Microcal Origin 5.0. Se trabajó con tampón fosfato a ese valor de pH, para los ensayos posteriores.

2.2.12.2. Determinación del efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica

Se procedió a determinar la actividad proteolítica con BApNA, de la fracción más activa al final del proceso, a las temperaturas de 20, 30, 37,5, 45, 50, 60 y 70° C.

En cada ensayo, se realizó una incubación previa de la solución de tampón fosfato 50 mM al pH óptimo, hasta que alcanzó la temperatura requerida. Entonces, se hizo una mezcla de reacción, con 3,0 ml de tampón, 300 µl de la muestra y 300 µl de sustrato, en un tubo de ensayo que fue mantenido en incubación, a la misma temperatura.

En seguida, se procedió a medir el valor de la densidad óptica en el espectrofotómetro, cada minuto, durante 3 minutos. Para cada medición, se utilizó un volumen de 1,2 ml de la mezcla de reacción.

Al final, se realizó la gráfica de actividad enzimática (U/ml) contra temperatura y se determinó la temperatura óptima, en el programa Microcal Origin 5.0.

2.2.12.3. Determinación del efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad proteolítica

Se prepararon soluciones de BApNA en dimetil formamida, en concentraciones de 1, 3, 5, 7, 9 y 10 mg/ml.

A continuación, se determinó espectrofotométricamente la actividad proteolítica para cada concentración de sustrato, con una mezcla de reacción de 1,0 ml de solución tampón, 100 μ l del extracto enzimático y 100 μ l de la solución de sustrato.

Finalmente, se realizó la gráfica de actividad enzimática (U/ml) contra concentración de BApNA (mM) y con ayuda del programa Microcal Origin 5.0, se realizó una regresión no lineal hiperbólica, con el fin de determinar los parámetros cinéticos K_M y $V_{m\acute{a}x}$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. MÉTODOS PRUEBAS PRELIMINARES PARA LA OBTENCIÓN Y EL SECADO DEL LÁTEX DE FRUTOS DE PLANTAS DEL GÉNERO *Vasconcella*

Para establecer un proceso adecuado de obtención y secado del látex de frutos verdes de plantas del género *Vasconcella*, se realizaron pruebas preliminares, con frutos de babaco (*V. x heilbornii* var. babaco) y de chamburo (*V. cundinamarcensis*).

3.1.1. OBTENCIÓN DEL LÁTEX

Se observó que, al realizar cortes en la superficie de los frutos, el látex fue exudado y pudo ser recogido. Se tomaron, por separado, el látex que cayó en forma de gotas, al cual se lo denominó látex fluido y el látex que se coaguló en la superficie del fruto, al cual se lo denominó látex coagulado, para, posteriormente, comparar la concentración proteica, la actividad caseinolítica y la actividad caseinolítica específica, en los extractos acuosos preparados a partir de los látex secos, cuyos valores se muestran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Concentración proteica, actividades caseinolítica y caseinolítica específica en extractos acuosos de látex fluido y látex coagulado, de frutos de babaco (*V. x heilbornii* babaco) y de chamburo (*V. cundinamarcensis*)

Muestra	Tipo de látex	Concentración de proteína (mg/ml)	Actividad caseinolítica (U/ml)	Actividad caseinolítica específica (U/mg)
Babaco	Fluido	2,63	36,58	13,91
	Coagulado	2,34	29,63	12,69
Chamburo	Fluido	3,20	101,80	31,81
	Coagulado	2,85	79,46	27,88

Se observa que los valores de concentración proteica y de actividad son menores en los extractos acuosos que se prepararon a partir de los látex que se coagularon. Esto se explicaría porque, parte de la muestra activa pudo haber quedado encerrada en el interior de los coágulos que se formaron. Además, es posible que, al momento de retirar el látex coagulado de la superficie de los frutos, se hayan incorporado impurezas, como trozos de corteza o de pulpa, a las muestras. Estos factores pudieron haber dificultado la solubilización de las proteasas en los extractos acuosos y, por consiguiente, haber disminuido la actividad proteolítica en los extractos.

En ambos casos, la actividad caseinolítica específica en el látex fluido es mayor que en el látex coagulado. En el babaco, es 10,0% mayor, mientras que en el chamburo, es 14,0% mayor.

Se decidió no colocar aditivos, como antioxidantes, preservantes o reductores, en el látex, debido a que el secado fue realizado inmediatamente después de la obtención en el laboratorio. Para esta decisión, también se consideró que el estudio de Novoa (2 005) concluyó que no se justificaba la utilización de antioxidantes (ascorbato de sodio, sorbato de sodio, sal cuaternaria del EDTA, metabisulfito de sodio y cisteína) con los látex de lechero y de flor de nochebuena, debido a la estabilidad que presentó la actividad proteolítica de los látex, durante los 17 días de almacenamiento de los mismos.

3.1.2. SECADO DEL LÁTEX

El secado en estufa fue elegido como método apropiado, debido al estudio de Alcayaga (2 004), que determinó la influencia de tres métodos de secado (secado al vacío, secado en estufa y liofilización), sobre la actividad enzimática en el látex de chamburo y concluyó que: “la actividad específica del látex deshidratado, no fue afectada por el método de secado utilizado”.

Se compararon los efectos sobre la actividad proteolítica en el látex, de un secado a 40° C (Gómez, 2 008) y un secado a 55° C (Scheldeman y Van Damme, 2 005)

en estufa. Los valores de concentración proteica, actividad caseinolítica y actividad caseinolítica específica, en los extractos acuosos preparados a partir del látex secado a las dos condiciones mencionadas, se muestran en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Concentración proteica, actividades caseinolítica y caseinolítica específica en extractos acuosos de látex de frutos de babaco (*V. × heilbornii babaco*) y chamburo (*V. cundinamarcensis*), a diferentes temperaturas de secado

Especie	Temperatura de secado	Concentración proteica (mg/ml)	Actividad caseinolítica (U/ml)	Actividad caseinolítica específica (U/mg)
Babaco	40° C	2,63	36,09	13,73
	55° C	2,64	29,00	11,01
Chamburo	40° C	3,21	101,80	31,76
	55° C	3,20	83,93	26,27

Se observa que la temperatura de secado de los látex tuvo un efecto considerable sobre la actividad caseinolítica de los extractos acuosos. La actividad caseinolítica específica de los extractos acuosos correspondientes a la temperatura de secado de 40° C, es mayor en un 25% para el babaco y en un 21% para el chamburo, con respecto a los extractos preparados a partir de los látex secados a 55° C. Esto se explicaría directamente por el efecto desnaturizante que tiene la temperatura sobre las proteínas.

Según los resultados de las pruebas preliminares, sería conveniente utilizar en los ensayos definitivos, el látex en polvo, obtenido luego de un secado en estufa, a 40° C, del látex fluido que se extrae de los frutos verdes de las plantas del género *Vasconcella*.

En los Anexos B y C, se muestran los resultados del análisis de la significancia de la diferencia entre los valores obtenidos para las distintas condiciones de obtención y de secado del látex, respectivamente.

3.1.3. ESTABILIDAD DEL LÁTEX SECO ALMACENADO EN REFRIGERACIÓN

Se determinó la concentración proteica, actividad caseinolítica y actividad caseinolítica específica de los extractos acuosos, que se prepararon según lo descrito en el acápite 2.2.1, para tener una medida de la estabilidad de las proteasas del látex seco, almacenado en congelación. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Concentración proteica, actividades caseinolítica y caseinolítica específica en extractos acuosos de látex de frutos de babaco (*V. × heilbornii* var. babaco) y de chamburo (*V. cundinamarcensis*), preparados con 3 semanas de diferencia

Muestra	Semana	Concentración de proteína (mg/ml)	Actividad caseinolítica (U/ml)	Actividad caseinolítica específica (U/mg)
Babaco	1	2,63	36,58	13,91
	4	2,64	36,33	13,76
Chamburo	1	3,20	103,05	32,20
	4	3,19	100,83	31,66

Los valores obtenidos muestran que las proteasas presentes en el látex seco, almacenado en congelación, muestran una alta estabilidad, puesto que luego de tres semanas, han perdido únicamente un 1,09% en el babaco y un 1,69% en el chamburo, de su actividad caseinolítica específica.

Con base en este análisis, se considera que no es necesario añadir preservantes al látex en polvo, para su almacenamiento.

3.2. EXTRACTOS ACUOSOS PREPARADOS A PARTIR DE LÁTEX DE CHAMBURO (*V. cundinamarcensis*), COL DE MONTE (*V. monoica*) Y TORONCHE (*V. stipulata*)

El chamburo (*V. cundinamarcensis*), la col de monte (*V. monoica*) y el toronche (*V. stipulata*) fueron las tres especies seleccionadas del género *Vasconcella*, debido a que han sido encontradas en el Ecuador (Yaguache y Medina, 2 003), a que se han realizado estudios acerca de la actividad proteolítica del látex de sus frutos (Scheldeman y otros, 2 003) y a que se hallaron plantas con frutos verdes, a las que fue posible acceder para recolectarlos.

3.2.1. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS

En primer lugar, se procedió a obtener y secar los látex de los frutos recolectados en la provincia de Loja, pertenecientes a las tres especies del género *Vasconcella*, seleccionadas de acuerdo con los criterios que se explicaron en la sección 2.2.2. Además, se trabajó con frutos verdes de babaco, que es la especie más conocida y de mayor importancia comercial de este género, con el fin de comparar los resultados obtenidos con los de estudios similares.

Para ello, se tomó únicamente el látex fluido de cada fruto y se secó en la estufa, a 40° C, según el acápite 2.2.4.

Las cantidades de látex fluido y de látex seco, que se obtuvieron de cada fruto, se relacionan directamente con su tamaño. De este modo, del babaco, que es el fruto más grande, se obtuvo el rendimiento más alto, mientras que, la menor cantidad de látex fue obtenida del fruto más pequeño, la col de monte.

En la Tabla 3.4, se muestran los valores del rendimiento en látex por fruto, de cada especie, así como el contenido de humedad en ellos.

Tabla 3.4. Látex fluido y látex seco obtenidos de frutos de babaco (*V. × heilbornii* var. babaco), chamburo (*V. cundinamarcensis*), col de monte (*V. monoica*) y toronche (*V. stipulata*)

Muestra	Látex fluido por fruto (mg/fruto)	Látex seco por fruto (mg/fruto)	Porcentaje de humedad en el látex (%)
Babaco (<i>V. × heilbornii</i> var. babaco)	722,6	142,1	80,34
Chamburo (<i>V. cundinamarcensis</i>)	480,3	126,5	73,67
Col de monte (<i>V. monoica</i>)	465,9	125,9	72,97
Toronche (<i>V. stipulata</i>)	602,2	135,1	77,57

El porcentaje de humedad del látex de babaco, es semejante al valor obtenido por Marcillo (2 005), que es de $(79,24 \pm 0,40)$ % y se muestra en la Tabla 1.2. Los látex del chamburo, la col de monte y el toronche tienen apariencias similares y, en los tres casos, una humedad cercana al 75,0%.

Se observó que el látex seco, tuvo forma de polvo blanquecino, con una tonalidad crema, en el caso del babaco y la col de monte, y una tonalidad rosácea, en el chamburo y el toronche.

Para determinar la concentración proteica y la actividad proteolítica de los látex, se prepararon suspensiones, con una concentración de 5 mg/ml, de polvo de látex en tampón fosfato diácido de sodio, 50 mM y pH 7,5, mediante el procedimiento descrito en el acápite 2.2.5.

3.2.2. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA Y ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EN LOS EXTRACTOS ACUOSOS

Se procedió a determinar la concentración proteica y las actividades caseinolítica, esterásica y proteolítica, en los extractos acuosos preparados de acuerdo con los

procedimientos indicados en los acápites 2.2.6 y 2.2.7. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Concentración proteica, actividades caseinolítica, esterásica y proteolítica en los extractos acuosos de látex de frutos de babaco (*V. × heilbornii* var. babaco), chamburo (*V. cundinamarcensis*), col de monte (*V. monoica*) y toronche (*V. stipulata*)

Extracto acuoso	Concentración de proteína (mg/ml)	Actividad caseinolítica específica (U/mg)	Actividad esterásica específica (mU/mg)	Actividad proteolítica específica (mU/mg)
Babaco (<i>V. × heilbornii</i> var. babaco)	2,71	8,11	85,76	51,35
Chamburo (<i>V. cundinamarcensis</i>)	3,20	31,81	112,19	78,91
Col de monte (<i>V. monoica</i>)	3,10	28,44	117,59	77,93
Toronche (<i>V. stipulata</i>)	2,99	44,08	127,46	110,77

En todos los casos fue necesario realizar diluciones, para determinar la concentración proteica en los extractos acuosos. La concentración proteica más alta, observada en el extracto acuoso de chamburo, fue 18,30% mayor que la más baja, correspondiente al extracto acuoso de babaco

El extracto acuoso más activo corresponde al látex de toronche. Los valores correspondientes a sus actividades caseinolítica, esterásica y proteolítica son mayores que las actividades de los extractos de látex de chamburo y de col de monte.

Además, se observa que los valores de las actividades caseinolítica, esterásica y proteolítica son considerablemente menores en los extractos acuosos correspondientes al babaco. Existe entonces, correspondencia con los resultados obtenidos por Scheldeman y Van Damme (2 005), que se muestran en la Tabla 1.4, los cuales determinan que la actividad proteolítica en el látex de babaco, es la menor, entre los frutos analizados. Por esto, desde este punto, se trabajó

únicamente con los extractos correspondientes a los látex de las tres especies seleccionadas del género *Vasconcella*.

3.3. EVALUACIÓN DE LA PURIFICACIÓN PRIMARIA DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS

Se realizó la purificación primaria de los extractos acuosos, por adición de etanol al 96,0%, de acuerdo con lo descrito en el acápite 2.2.8. En los extractos obtenidos, se determinó la concentración proteica y las actividades caseinolítica y esterásica, con el fin de evaluar el proceso. Además, se determinaron los rendimientos en cantidad de proteína y en actividad proteolítica, y el grado de purificación, para cada extracto. En los Anexos D y E, se muestran ejemplos del cálculo de estos parámetros.

En los extractos semipurificados en los que se determinó la actividad proteolítica con BApNA, la resuspensión de las proteínas precipitadas fue realizada en un volumen de 20 ml de tampón fosfato 50 mM y pH 7,5, es decir, igual al volumen del extracto acuoso utilizado. El propósito fue tener extractos con mayor concentración de proteína. En la Tabla 3.6, se presentan los valores de concentración proteica de los extractos semipurificados obtenidos.

Tabla 3.6. Concentración proteica de los extractos semipurificados de látex de chamburo (*V. cundinamarcensis*), toronche (*V. stipulata*) y col de monte (*V. monoica*), resuspendidos en diferentes volúmenes de tampón fosfato 50 mM y pH 7,5

Espece	Concentración proteica en el extracto resuspendido en 40 ml de tampón (mg/ml)	Concentración proteica en el extracto resuspendido en 20 ml de tampón (mg/ml)
Chamburo (<i>V. cundinamarcensis</i>)	0,91	1,87
Toronche (<i>V. stipulata</i>)	0,79	1,71
Col de monte (<i>V. monoica</i>)	0,82	1,73

Los valores de las mediciones realizadas para determinar la concentración proteica y las actividades caseinolítica, esterásica y proteolítica de cada extracto acuoso, se incluyen en el Anexo G.

3.3.1. PURIFICACIÓN PRIMARIA DEL EXTRACTO ACUOSO DE LÁTEX DE CHAMBURO (*V. cundinamarcensis*)

La Tabla 3.7 muestra los valores de las actividades caseinolítica, esterásica y proteolítica del extracto de látex de frutos de chamburo, obtenido de la purificación primaria.

Tabla 3.7. Actividades caseinolítica, esterásica y proteolítica en el extracto semipurificado de látex de chamburo (*V. cundinamarcensis*)

Actividad caseinolítica (U/ml)	Actividad esterásica (mU/ml)	Actividad proteolítica (mU/ml)
38,23	135,32	190,00

En la Tabla 3.8, se muestran los rendimientos en cantidad de proteína y en actividad y, el grado de purificación, luego de la purificación primaria del extracto de látex de chamburo.

Tabla 3.8. Rendimiento en proteína y en actividades caseinolítica, esterásica y proteolítica y grado de purificación en el extracto semipurificado de látex de chamburo (*V. cundinamarcensis*)

Rendimiento en proteína (%)	Actividad caseinolítica		Actividad esterásica		Actividad proteolítica	
	Rendimiento en actividad (%)	G.P. (veces)	Rendimiento en actividad (%)	G.P. (veces)	Rendimiento en actividad (%)	G.P. (veces)
57,03	75,10	1,31	75,38	1,32	79,01	1,45

Los valores de rendimientos en actividades caseinolítica, esterásica y proteolítica con BApNA indican que, en casi un 20%, se eliminaron proteínas que no presentaban actividad proteolítica. En otros términos, se logró obtener enzimas

con mayor actividad, esto se confirma con el grado de purificación, que es mayor a 1 en todos los casos.

3.3.2. PURIFICACIÓN PRIMARIA DEL EXTRACTO ACUOSO DE LÁTEX DE COL DE MONTE (*V. monoica*)

En la Tabla 3.9 se presentan los valores de actividad caseinolítica, actividad esterásica y actividad proteolítica, del extracto correspondiente al látex de col de monte, después de la purificación primaria.

Tabla 3.9. Actividades caseinolítica, esterásica y proteolítica en el extracto semipurificado de látex de col de monte (*V.monoica*)

Actividad caseinolítica (U/ml)	Actividad esterásica (mU/ml)	Actividad proteolítica (mU/ml)
32,48	110,46	177,95

La Tabla 3.10 muestra los rendimientos en cantidad de proteína y en actividad y, el grado de purificación en el extracto semipurificado de látex de col de monte, con respecto a sus actividades caseinolítica, esterásica y proteolítica.

Tabla 3.10. Rendimiento en proteína y en actividades caseinolítica, esterásica y proteolítica y grado de purificación en el extracto semipurificado de látex de col de monte (*V. monoica*)

Rendimiento en proteína (%)	Actividad caseinolítica		Actividad esterásica		Actividad proteolítica	
	Rendimiento en actividad (%)	G.P. (veces)	Rendimiento en actividad (%)	G.P. (veces)	Rendimiento en actividad (%)	G.P. (veces)
52,90	73,68	1,39	60,61	1,15	77,34	1,63

Los grados de purificación de 1,39; 1,15 y 1,63 veces, indican que se recuperaron enzimas activas y se eliminaron otras proteínas presentes en el extracto acuoso.

3.3.3. PURIFICACIÓN PRIMARIA DEL EXTRACTO ACUOSO DE LÁTEX DE TORONCHE (*V. stipulata*)

En la Tabla 3.11 se muestran los valores de las actividades caseinolítica, esterásica y proteolítica, en el extracto semipurificado del látex de toronche.

Tabla 3.11. Actividades caseinolítica, esterásica y proteolítica en el extracto semipurificado de látex de toronche (*V.stipulata*)

Actividad caseinolítica (U/ml)	Actividad esterásica (mU/ml)	Actividad proteolítica (mU/ml)
49,98	115,99	327,27

A continuación, se determinaron los rendimientos en cantidad de proteína y en actividades caseinolítica, esterásica y proteolítica y, el grado de purificación, en el extracto semipurificado. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 3.12.

Tabla 3.12. Rendimiento en proteína y en actividades caseinolítica, esterásica y proteolítica y grado de purificación en el extracto semipurificado de látex de toronche (*V.stipulata*)

Rendimiento en proteína (%)	Actividad caseinolítica		Actividad esterásica		Actividad proteolítica	
	Rendimiento en actividad (%)	G.P. (veces)	Rendimiento en actividad (%)	G.P. (veces)	Rendimiento en actividad (%)	G.P. (veces)
52,84%	75,83	1,44	60,87	1,15	88,63	1,73

Mediante la purificación primaria, se obtuvo un extracto con una mayor concentración de enzimas activas, lo cual se refleja en los valores del grado de purificación, que son de 1,44; 1,15 y 1,73 veces, respectivamente.

En los tres casos, la precipitación por adición de etanol, permitió recuperar enzimas activas y eliminar otras proteínas, por lo tanto, es un proceso adecuado para la purificación de los extractos acuosos preparados a partir de látex de especies del género *Vasconcella*.

3.4. SELECCIÓN DEL EXTRACTO SEMIPURIFICADO MÁS ACTIVO

Se compararon las actividades caseinolítica específica, esterásica específica y proteolítica específica, de los extractos semipurificados obtenidos. El extracto más activo fue el del látex de toronche. Su actividad caseinolítica fue 51,08% mayor a la del chamburo, que tuvo el segundo más alto valor. Su actividad esterásica fue apenas 0,97% menor que la del chamburo, que fue la mayor de las tres y, su actividad proteolítica fue 85,43% y 87,73% mayor que las actividades de la col de monte y del chamburo, respectivamente.

Por este motivo, se seleccionó el extracto de toronche para continuar con el proceso de purificación. En el estudio de Scheldeman *et. al.* (2 003), resumido en el acápite 1.3.2.4, el látex de toronche (*V. stipulata*) también presentó la mayor actividad proteolítica con BApNA, con respecto al de chamburo (*V. cundinamarcencis*) y al de col de monte (*V. monoica*).

En la Figura 3.1, se muestran los valores obtenidos.

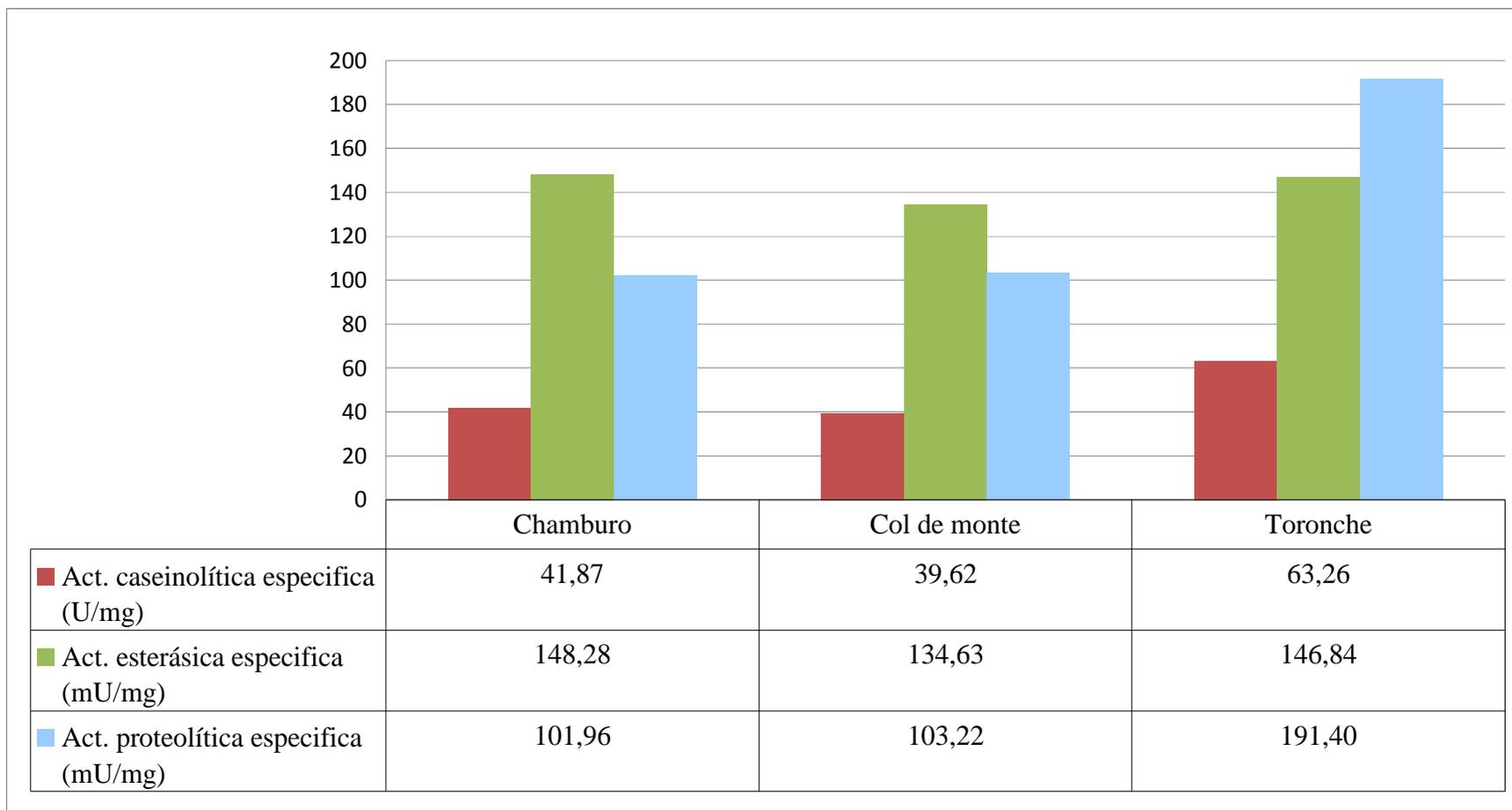


Figura 3.1. Actividades caseinolítica específica y esterásica específica en los extractos semipurificados de látex de chamburo (*V. cundinamarcensis*), toronche (*V. stipulata*) y col de monte (*V. monoica*)

3.5. PURIFICACIÓN CROMATOGRÁFICA DEL EXTRACTO SEMIPURIFICADO DE TORONCHE (*V. stipulata*), CON RESPECTO A LAS ACTIVIDADES CASEINOLÍTICA Y ESTERÁSICA

3.5.1. PURIFICACIÓN CROMATOGRÁFICA POR FILTRACIÓN EN GEL

Se determinó la cantidad de proteína y el número de unidades de actividad caseinolítica y de actividad esterásica en un volumen de 30 ml del extracto semipurificado de toronche (*V. stipulata*), que fue seleccionado por ser el más activo. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 3.13.

Tabla 3.13. Contenido de proteína y unidades de actividad caseinolítica y de actividad esterásica en el extracto semipurificado de látex de toronche (*V. stipulata*)

Parámetro	Valor
Contenido de proteína (mg)	23,70
Actividad caseinolítica (U)	1499,25
Actividad esterásica (U)	3,48

Se llevó a cabo la purificación cromatográfica del extracto semipurificado de látex de toronche, por filtración en gel, de acuerdo con el procedimiento indicado en el acápite 2.2.9. Se recolectaron las fracciones resultantes y se determinaron la concentración proteica y las actividades caseinolítica y esterásica en ellas. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 3.14 y se representan gráficamente en la Figura 3.2.

Los valores de las mediciones realizadas para determinar los parámetros mencionados, se muestran en el Anexo G.

Tabla 3.14. Concentración de proteína y actividades caseinolítica y esterásica en las fracciones recolectadas de la cromatografía de filtración en gel del extracto semipurificado de látex de toronche (*V.stipulata*)

Fracción	Concentración proteica (mg/ml)	Actividad caseinolítica (U/ml)	Actividad esterásica (mU/ml)
1	0,000	0,00	0,00
2	0,020	0,00	0,00
3	0,045	0,05	0,00
4	0,058	0,10	0,00
5	0,066	0,15	0,00
6	0,071	0,20	0,00
7	0,073	0,20	0,00
8	0,076	0,30	0,00
9	0,036	0,10	0,00
10	0,005	0,00	0,00
11	0,004	0,00	0,00
12	0,004	0,00	0,00
13	0,000	0,00	0,00
14	0,045	0,30	0,00
15	0,213	8,38	8,28
16	0,481	25,76	16,57
17	0,724	60,03	38,66
18	0,888	71,87	93,89
19	1,001	59,84	135,32
20	0,990	52,96	140,84
21	0,854	55,07	138,08
22	0,563	35,69	77,32
23	0,292	13,01	16,57
24	0,127	2,03	5,52
25	0,072	0,30	0,00
26	0,047	0,25	0,00
27	0,029	0,15	0,00
28	0,014	0,05	0,00
29	0,004	0,00	0,00
30	0,001	0,00	0,00

Se puede observar que las fracciones 17, 18 y 19 presentan la mayor actividad caseinolítica, mientras que las fracciones 19, 20 y 21 tienen la mayor actividad esterásica.

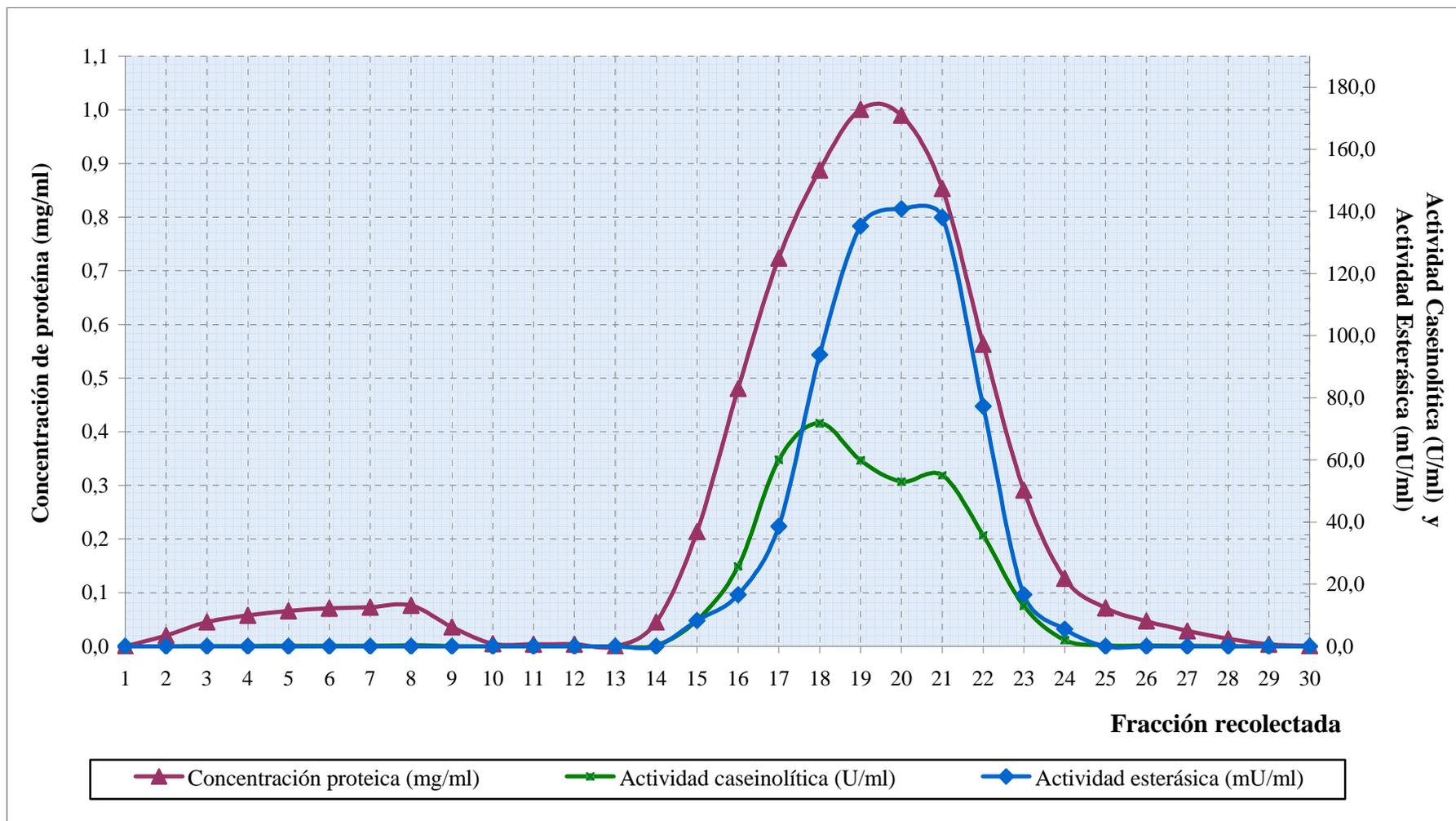


Figura 3.2. Concentración proteica, actividades caseinolítica y esterásica contra número de fracción recolectada de la cromatografía de filtración en gel del extracto semipurificado preparado a partir de látex de toronche (*V. stipulata*)

Se observa que las fracciones 2 a la 9, presentan una concentración proteica baja, que corresponde a una ligera elevación en el cromatograma. Posteriormente, de la fracción 14 a la 25, se aprecia un pico de concentración, claramente definido, el cual tiene un valor máximo en la fracción 19. Finalmente, la concentración de proteína desciende hasta cero, en la fracción 30.

Con respecto a la actividad caseinolítica, se observan picos superpuestos, con sus puntos más altos en las fracciones 18 y 21. Mientras que en la curva de actividad esterásica, se observa un solo pico, desplazado hacia el lado derecho, con respecto al pico de concentración proteica.

Con el fin de identificar las fracciones más activas, se determinaron las actividades caseinolítica específica y esterásica específica, de cada fracción. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 3.15 y se representan en la Figura 3.3. No se incluyen las fracciones cuya actividad caseinolítica específica fue igual a cero.

Tabla 3.15. Actividades caseinolítica específica y esterásica específica en las fracciones recolectadas de la cromatografía de filtración en gel del extracto semipurificado de látex de toronche (*V.stipulata*)

Fracción	Actividad caseinolítica específica (U/mg)	Actividad esterásica específica (U/mg)	Fracción	Actividad caseinolítica específica (U/mg)	Actividad esterásica específica (U/mg)
3	1,11	0,000	18	80,96	0,106
4	1,72	0,000	19	59,78	0,135
5	2,27	0,000	20	53,49	0,142
6	2,82	0,000	21	64,52	0,162
7	2,74	0,000	22	63,38	0,137
8	3,95	0,000	23	44,62	0,057
9	2,78	0,000	24	16,03	0,044
14	6,65	0,000	25	4,20	0,000
15	39,27	0,039	26	5,29	0,000
16	53,59	0,034	27	5,24	0,000
17	82,94	0,053	28	3,50	0,000

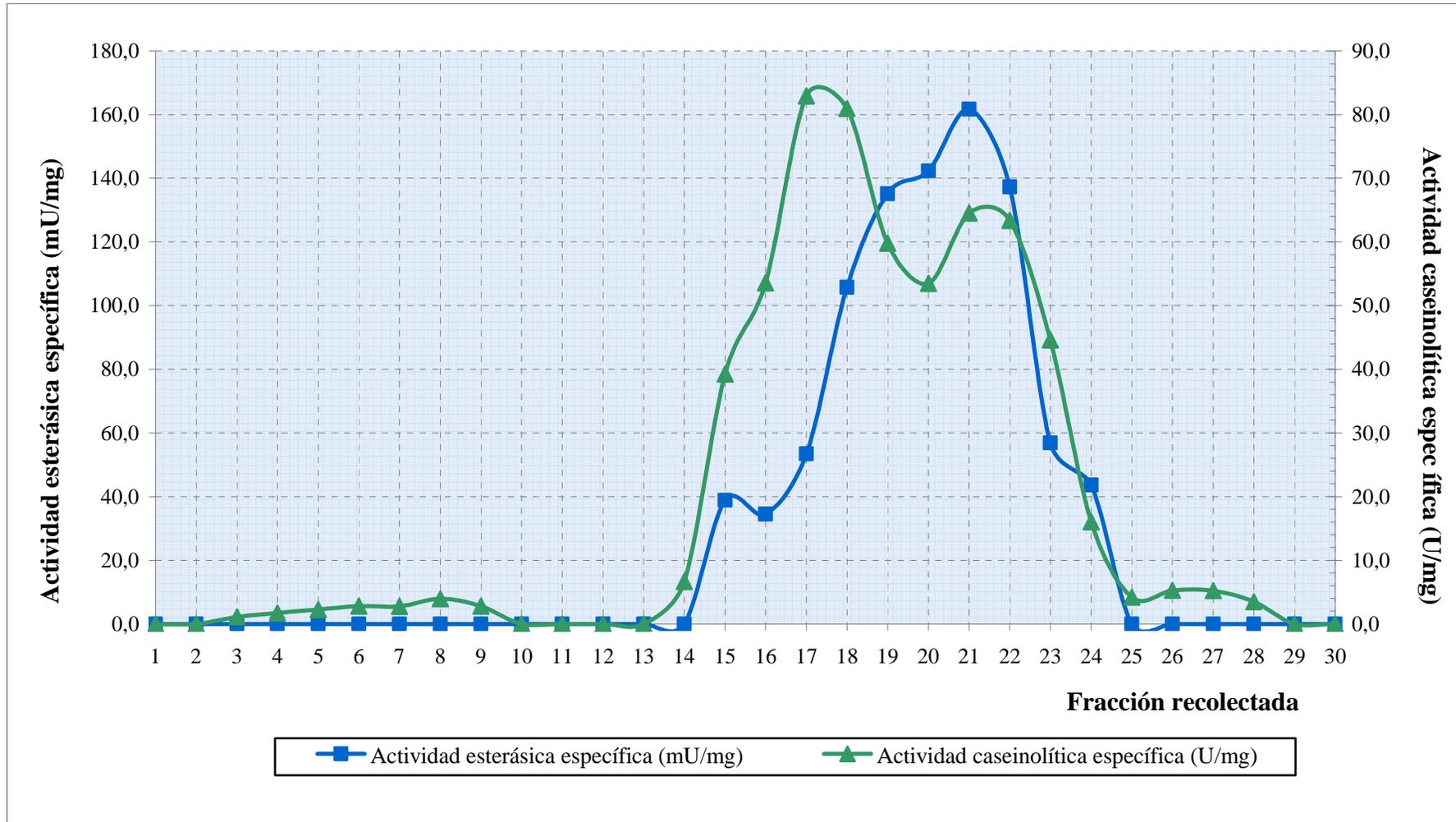


Figura 3.3. Actividades caseinolítica específica y esterásica específica contra número de fracción recolectada de la cromatografía de filtración en gel del extracto semipurificado, preparado a partir de látex de toronche (*V. stipulata*)

Se observa que las fracciones más activas son la 17, por su actividad caseinolítica específica y la 21, por su actividad esterásica específica.

La Tabla 3.16 muestra los rendimientos obtenidos en proteína, en actividades caseinolítica y esterásica y el grado de purificación de cada fracción, con respecto al extracto semipurificado. No se incluyeron las fracciones que tuvieron rendimientos en actividad caseinolítica de cero.

Tabla 3.16. Rendimientos en proteína, en actividad caseinolítica y en actividad esterásica y grado de purificación en las fracciones recolectadas de la cromatografía de filtración en gel del extracto semipurificado de látex de toronche (*V.stipulata*)

Fracción	Rendimiento en proteína (%)	Actividad caseinolítica		Actividad esterásica	
		Rendimiento en actividad (%)	Grado de purificación (veces)	Rendimiento en actividad (%)	Grado de purificación (veces)
3	0,66	0,01	0,02	0,00	0,00
4	0,84	0,02	0,02	0,00	0,00
5	0,96	0,03	0,03	0,00	0,00
6	1,03	0,05	0,04	0,00	0,00
7	1,06	0,05	0,04	0,00	0,00
8	1,11	0,07	0,06	0,00	0,00
9	0,52	0,02	0,04	0,00	0,00
14	0,66	0,07	0,10	0,00	0,00
15	3,11	1,93	0,56	0,83	0,26
16	7,00	5,93	0,77	1,67	0,23
17	10,54	13,81	1,19	3,89	0,36
18	12,92	16,54	1,16	9,44	0,72
19	14,57	13,77	0,86	13,61	0,92
20	14,41	12,19	0,77	14,17	0,97
21	12,43	12,67	0,93	13,89	1,10
22	8,20	8,21	0,91	7,78	0,93
23	4,24	2,99	0,64	1,67	0,39
24	1,84	0,47	0,23	0,56	0,30
25	1,04	0,07	0,06	0,00	0,00
26	0,69	0,06	0,08	0,00	0,00
27	0,42	0,03	0,08	0,00	0,00
28	0,21	0,01	0,05	0,00	0,00

El rendimiento total en cantidad de proteína, del proceso de purificación por cromatografía de filtración en gel, fue del 98,64%, valor que indica que casi toda la proteína fue recuperada en las fracciones resultantes.

El eluato mostró mayor rendimiento en proteína en las fracciones de la 17 a la 21, las cuales, a su vez, presentaron el mayor rendimiento en actividad caseinolítica. Los porcentajes de rendimiento más altos en actividad esterásica, se presentaron en las fracciones 19 a la 22.

La fracción 17, con un valor de 1,19 veces es la fracción que se purificó de mejor manera, con respecto a su actividad caseinolítica, mientras que con respecto a la actividad esterásica, fue la fracción 21, purificada 1,10 veces.

Finalmente, por los resultados obtenidos, se decidió formar un lote con las fracciones 15 a la 24 y con él, llevar a cabo la purificación por cromatografía de intercambio iónico.

3.5.2. PURIFICACIÓN CROMATOGRÁFICA POR INTERCAMBIO IÓNICO

Se determinó el contenido de proteína y el número de unidades de actividad caseinolítica y de actividad esterásica en el lote formado por las fracciones más activas de la filtración en gel. Los valores obtenidos se incluyen en la Tabla 3.17, que se presenta a continuación.

Tabla 3.17. Contenido de proteína y unidades de actividad caseinolítica y de actividad esterásica en el extracto de látex de toronche (*V. stipulata*) purificado por cromatografía de filtración en gel

Parámetro	Valor
Contenido de proteína (mg)	18,01
Actividad caseinolítica (U)	765,21
Actividad esterásica (U)	1,39

Entonces, se llevó a cabo la purificación por cromatografía de intercambio iónico, de acuerdo al procedimiento indicado en el acápite 2.2.9. En la Tabla 3.18, se muestran los valores de concentración proteica y actividades caseinolítica y esterásica en las fracciones recolectadas. No se incluyen las fracciones que presentaron una actividad caseinolítica menor a 0,05 U/ml. En la Figura 3.4, se presenta una gráfica de los valores mencionados, frente al número de fracción.

Tabla 3.18. Concentración de proteína y actividades caseinolítica y esterásica en las fracciones recolectadas de la cromatografía de intercambio iónico, con el extracto de látex de toronche (*V.stipulata*) purificado por filtración en gel

Fracción	Concentración protéica (mg/ml)	Actividad caseinolítica (U/ml)	Actividad esterásica (mU/ml)
5	0,042	0,15	0,00
12*	0,045	0,35	0,00
13	0,072	0,80	0,00
14	0,213	2,60	5,52
15	0,474	4,95	16,57
16	0,671	11,90	33,14
17	0,693	12,00	44,19
18	0,615	8,75	44,19
19	0,487	4,55	22,09
20	0,355	2,50	5,52
21	0,127	0,60	0,00
28*	0,039	0,15	0,00
29	0,758	6,50	16,57
30	0,430	0,45	5,52
31	0,086	0,25	0,00
32	0,058	0,25	0,00
33	0,044	0,15	0,00
34	0,028	0,10	0,00
35	0,030	0,10	0,00
36	0,075	0,25	0,00
37	0,062	0,20	0,00
38	0,041	0,10	0,00
39	0,033	0,10	0,00

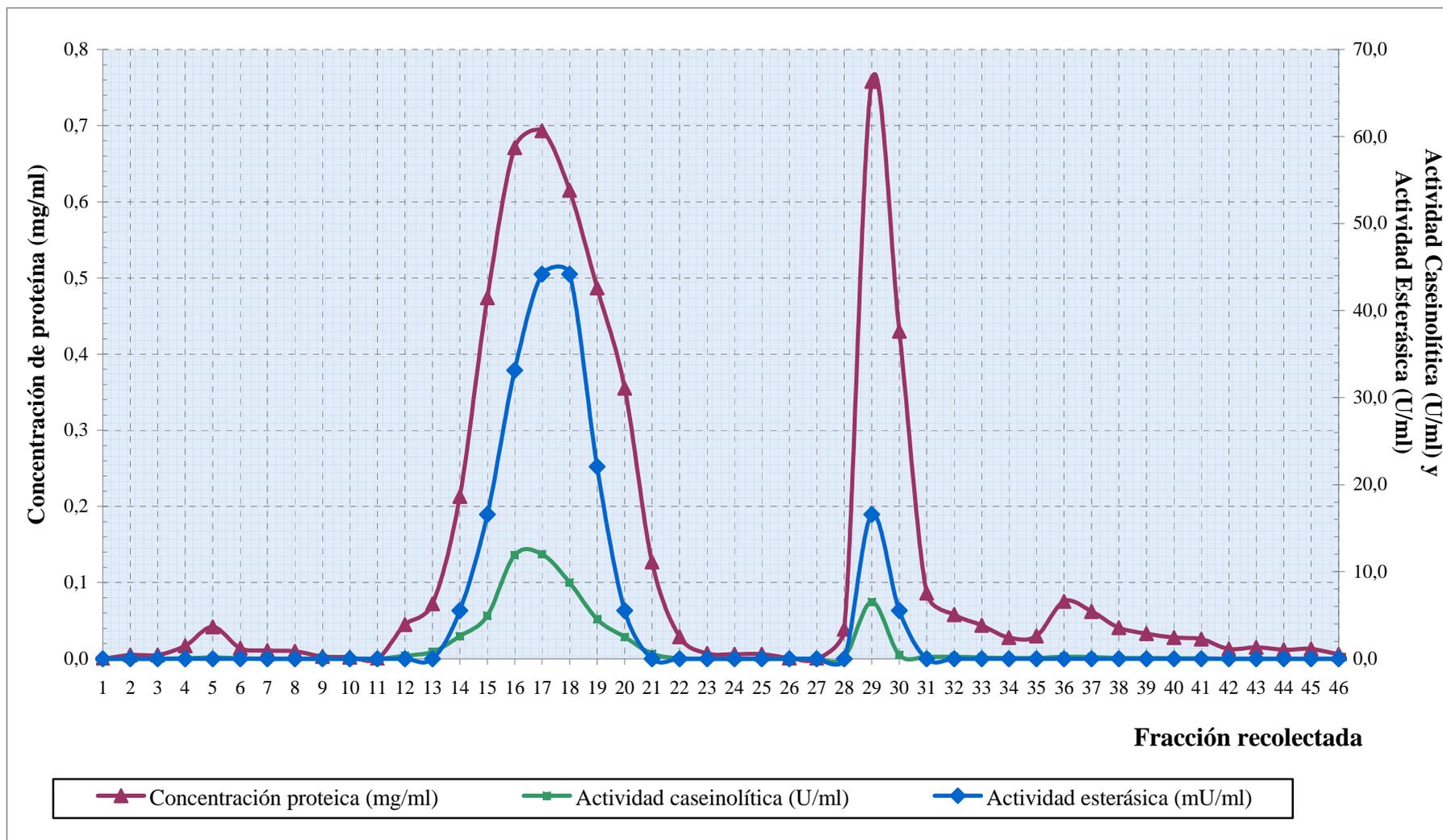


Figura 3.4. Concentración proteica, actividades caseinolítica y esterásica contra número de fracción recolectada de la cromatografía de intercambio iónico del extracto de látex de toronche (*V. stipulata*) purificado por filtración en gel

Las fracciones 1 a la 11 corresponden al lavado con tampón fosfato 50 mM y pH 7,5, luego de la alimentación de la muestra. Las fracciones 12 a la 27 corresponden a la elución con gradiente de concentración, desde 50 mM hasta 200 mM. Mientras que, las fracciones 28 a la 48, corresponden a una elución con gradiente, desde 200 mM hasta 500 mM.

Se observa que las fracciones 16, 17, 18 y 29 son las que presentan los valores más altos, tanto de concentración proteica, como de actividades caseinolítica, y esterásica. Sin embargo, estos valores son considerablemente menores a los obtenidos en las fracciones recolectadas de la cromatografía de filtración en gel.

El cromatograma muestra dos picos principales de concentración proteica, que coinciden con los picos de actividad. El primero de ellos, se extiende de la fracción 12 a la 22 y el segundo abarca las fracciones 28 a la 31.

La fracción de mayor concentración en proteína es la número 29, mientras que la fracción 17 es la que presenta mayor actividad caseinolítica y esterásica.

Para determinar cuáles son las fracciones más activas de la cromatografía de intercambio iónico, se determinó la actividad específica de cada una de ellas. En la Tabla 3.19 se muestran los valores de las actividades caseinolítica específica y esterásica específica, de cada fracción, excepto las que no presentaron actividades caseinolítica ni esterásica. En la Figura 3.5, se representan dichos valores, gráficamente.

Los valores de las mediciones realizadas para determinar la concentración proteica y las actividades caseinolítica y esterásica de cada fracción, se presentan en el Anexo G.

Tabla 3.19. Actividades caseinolítica específica y esterásica específica en las fracciones recolectadas de la cromatografía de intercambio iónico del extracto de látex de toronche (*V.stipulata*) purificado por filtración en gel

Fracción	Actividad caseinolítica específica (U/mg)	Actividad esterásica específica (mU/mg)
4	2,94	0,00
5	3,57	0,00
6	3,57	0,00
12*	7,78	0,00
13	11,11	0,00
14	12,21	25,93
15	10,44	34,96
16	17,73	49,39
17	17,32	63,76
18	14,23	71,85
19	9,34	45,37
20	7,04	15,56
21	4,72	0,00
22	1,72	0,00
28*	3,85	0,00
29	8,58	21,86
30	1,05	12,84
31	2,91	0,00
32	4,31	0,00
33	3,41	0,00
34	3,57	0,00
35	3,33	0,00
36	3,33	0,00
37	3,23	0,00
38	2,44	0,00
39	3,03	0,00
40	1,79	0,00
41	1,92	0,00

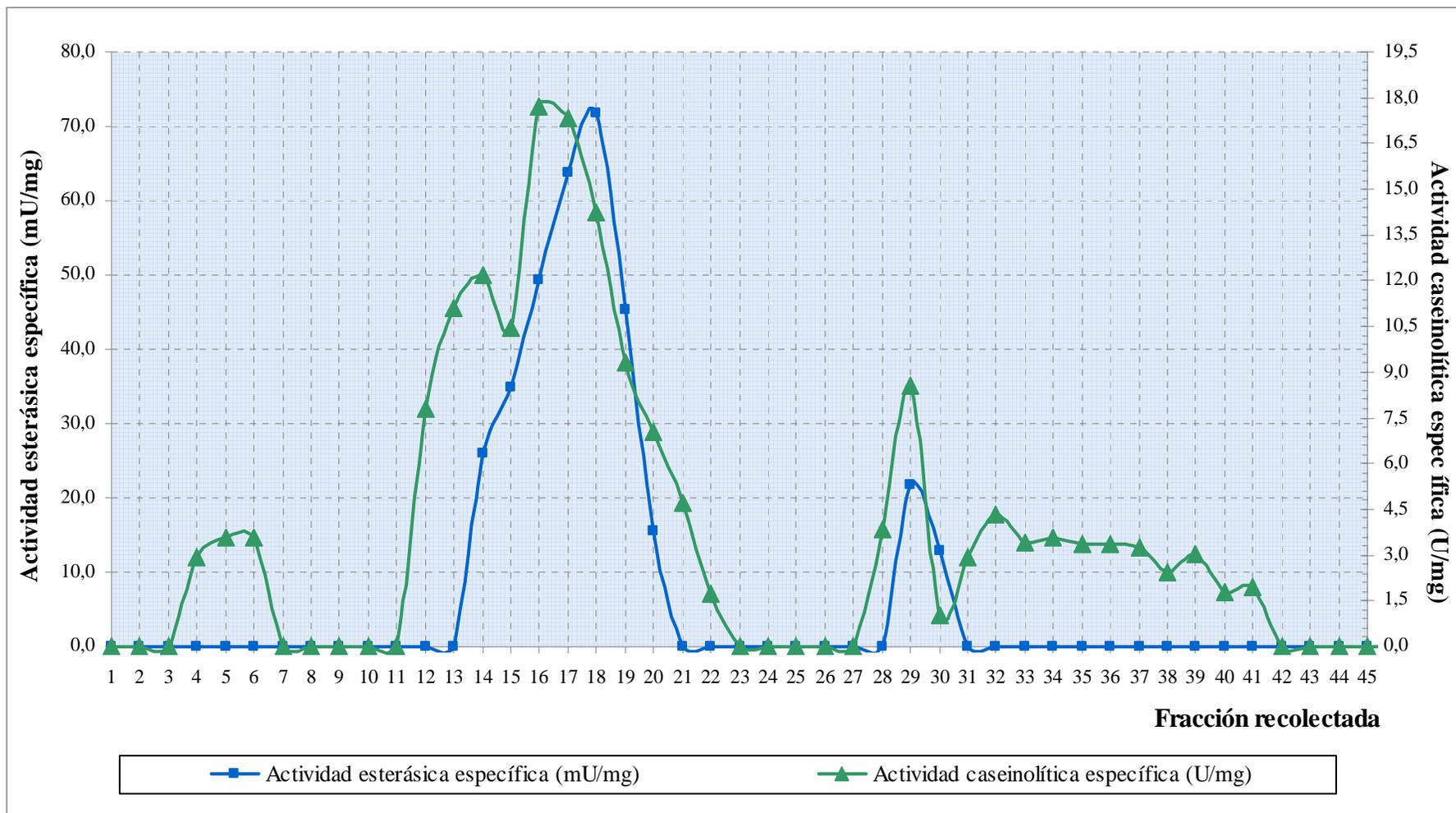


Figura 3.5. Actividades caseinolítica específica y esterásica específica contra número de fracción recolectada, para la cromatografía de intercambio iónico del extracto de látex de toronche (*V. stipulata*) purificado por filtración en gel

Las fracciones más activas son la 16, por su actividad caseinolítica específica de 17,73 U/mg y la 18, por su actividad esterásica específica de 71,85 mU/mg. Sin embargo, al comparar estos valores con los presentados por las fracciones más activas de la purificación por filtración en gel, que son 82,94 U/mg y 161,76 mU/mg, respectivamente, se observa que son significativamente menores.

Con el fin de tener otros parámetros de comparación, se procedió a determinar los rendimientos en cantidad de proteína y en actividades caseinolítica y esterásica, así como el grado de purificación en los eluatos recolectados.

La Tabla 3.20 presenta los valores obtenidos, sin incluir las fracciones cuyo rendimiento en actividad caseinolítica fue de cero.

La fracción de mayor rendimiento en cantidad de proteína, fue la número 29. La fracción 17 fue la que presentó el mayor rendimiento tanto en actividad caseinolítica, como en actividad esterásica.

El rendimiento total en cantidad de proteína fue del 94,72%, que indica que hubo una adecuada recuperación de las enzimas luego de la purificación. Por otro lado, el rendimiento total en actividad caseinolítica fue de apenas el 22,74% y en actividad esterásica, del 43,13%.

Con respecto a la actividad caseinolítica, la fracción 16 fue la que se purificó de mejor manera, con un valor de 0,42 veces, mientras que la fracción 18, purificada 0,75 veces, presentó el grado de purificación más alto, en actividad esterásica.

Tabla 3.20. Rendimientos en proteína, en actividad caseinolítica y en actividad esterásica y grado de purificación en las fracciones recolectadas de la cromatografía de intercambio iónico del extracto de látex de toronche (*V.stipulata*) purificado por filtración en gel

Fracción	Rendimiento en proteína (%)	Actividad caseinolítica		Actividad esterásica	
		Rendimiento en actividad (%)	Grado de purificación (veces)	Rendimiento en actividad (%)	Grado de purificación (veces)
4	0,3	0,02	0,07	0,00	0,00
5	0,7	0,06	0,08	0,00	0,00
6	0,2	0,02	0,08	0,00	0,00
12	0,7	0,14	0,18	0,00	0,00
13	1,2	0,31	0,26	0,00	0,00
14	3,5	1,02	0,29	1,31	0,34
15	7,9	1,94	0,25	3,92	0,45
16	11,2	4,67	0,42	7,84	0,64
17	11,5	4,70	0,41	10,46	0,82
18	10,2	3,43	0,33	10,46	0,93
19	8,1	1,78	0,22	5,23	0,59
20	5,9	0,98	0,17	1,31	0,20
21	2,1	0,24	0,11	0,00	0,00
22	0,5	0,02	0,04	0,00	0,00
28	0,6	0,06	0,09	0,00	0,00
29	12,6	2,55	0,20	3,92	0,28
30	7,2	0,18	0,02	1,31	0,17
31	1,4	0,10	0,07	0,00	0,00
32	1,0	0,10	0,10	0,00	0,00
33	0,7	0,06	0,08	0,00	0,00
34	0,5	0,04	0,08	0,00	0,00
35	0,5	0,04	0,08	0,00	0,00
36	1,2	0,10	0,08	0,00	0,00
37	1,0	0,08	0,08	0,00	0,00
38	0,7	0,04	0,06	0,00	0,00
39	0,5	0,04	0,07	0,00	0,00
40	0,5	0,02	0,04	0,00	0,00
41	0,4	0,02	0,05	0,00	0,00
TOTAL	94,72%	22,74%	-	45,76%	-

Los valores de actividad obtenidos fueron menores de lo esperado, si se consideran los resultados de la cromatografía de filtración en gel. Las causas pudieron estar en el proceso de purificación o en el método de determinación de la actividad proteolítica en las fracciones.

Es probable que el método de Anson modificado (Bastidas, 2 005), descrito en el acápite 2.2.6.1, no haya sido pertinente para medir la actividad en todas las fracciones obtenidas del proceso cromatográfico, 46 en total, tanto por la duración de cada ensayo (de aproximadamente 1 hora), como por su sensibilidad cuando se tienen extractos de concentración proteica baja.

Se decidió realizar una repetición de los procesos cromatográficos de purificación y esta vez, medir la actividad proteolítica de las fracciones obtenidas mediante el método que utiliza como sustrato BApNA (N- α -Benzoil-DL-Arginina-p-Nitroanilida), por su menor duración.

3.6. PURIFICACIÓN CROMATOGRÁFICA DEL EXTRACTO SEMIPURIFICADO DE LÁTEX DE TORONCHE (*Vasconcella stipulata*), CON RESPECTO A LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

3.6.1. PURIFICACIÓN CROMATOGRÁFICA POR FILTRACIÓN EN GEL, CON RESPECTO A LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

Se llevó a cabo una purificación cromatográfica por filtración en gel, con el extracto semipurificado del látex de toronche más concentrado, que se mencionó en el acápite 3.3.

En la Tabla 3.21, se presentan los valores de concentración proteica, actividad proteolítica y actividad proteolítica específica, en las fracciones resultantes del proceso cromatográfico, excepto aquellas que no presentaron actividad.

Tabla 3.21. Concentración de proteína y actividades proteolítica y proteolítica específica en las fracciones recolectadas de la cromatografía de filtración en gel del extracto semipurificado de látex de toronche (*V.stipulata*)

Fracción	Concentración proteica (mg/ml)	Actividad proteolítica (U/ml)	Actividad proteolítica específica (mU/mg)
10	0,057	0,001	11,92
11	0,058	0,001	11,69
12	0,068	0,001	10,00
13	0,081	0,001	16,75
14	0,086	0,001	15,89
15	0,042	0,001	16,31
18	0,045	0,001	15,12
19	0,171	0,007	39,99
20	0,695	0,027	38,54
21	1,069	0,138	128,69
22	1,386	0,275	198,74
23	1,474	0,309	209,54
24	1,496	0,413	276,58
25	1,397	0,288	205,96
26	0,863	0,201	232,99
27	0,526	0,025	46,68
28	0,180	0,006	34,02
29	0,144	0,003	23,66
30	0,073	0,001	9,39

La fracción 24 presenta la concentración proteica más alta y las mayores actividades proteolítica y proteolítica específica. Por tanto, el punto más alto de concentración coincide con el valor máximo de actividad.

En la Figura 3.6, se representan gráficamente los valores obtenidos, para cada fracción resultante de la purificación cromatográfica por filtración en gel.

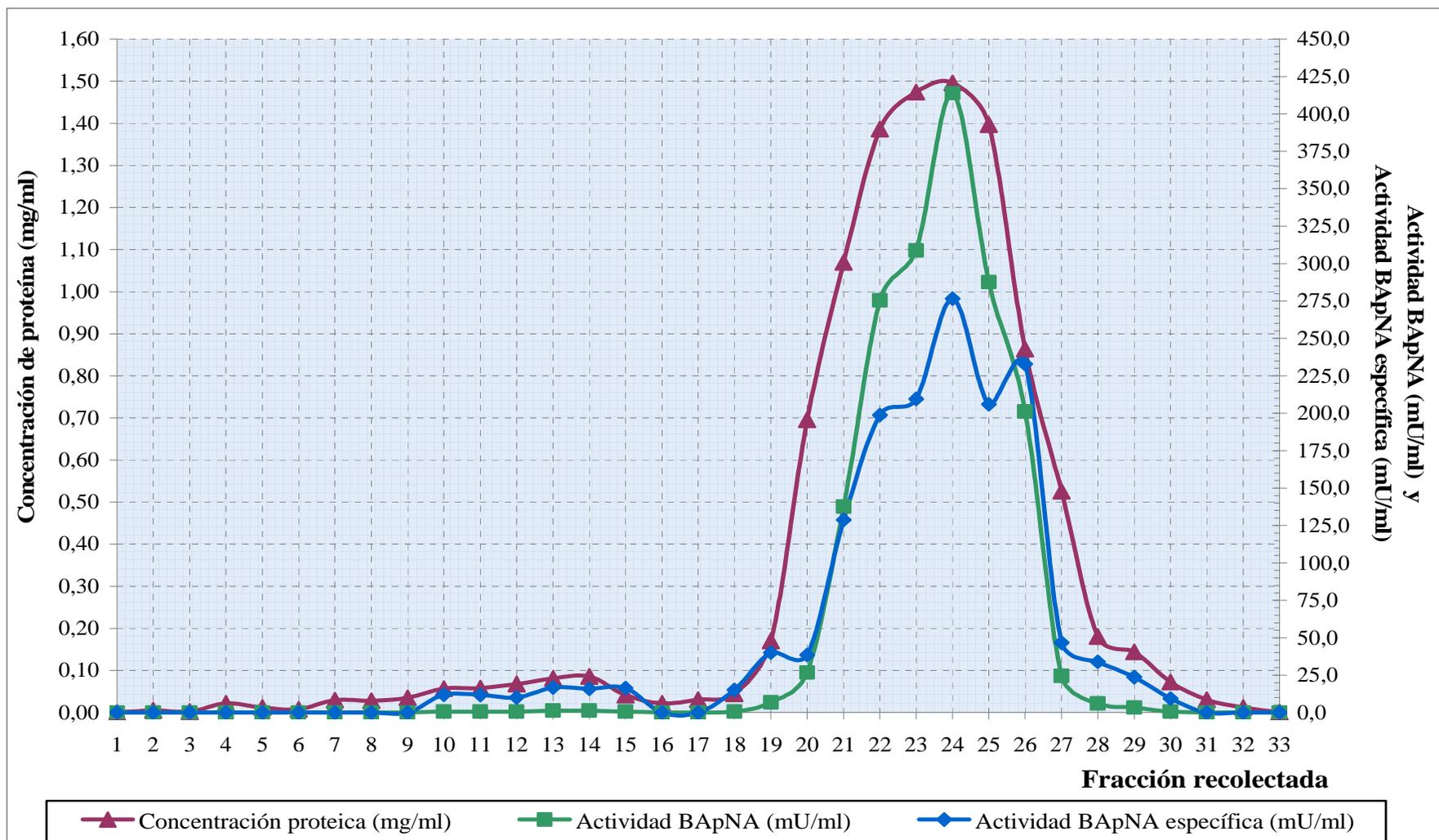


Figura 3.6. Concentración de proteína, actividades proteolítica y proteolítica específicas contra número de fracción recolectada de la cromatografía de filtración en gel del extracto semipurificado de látex de toronche (*V. stipulata*)

La gráfica muestra que la parte superior del pico de concentración proteica, coincide con los puntos más altos de la actividad proteolítica y la actividad proteolítica específica, en las fracciones 23 a la 26.

En la Tabla 3.22, se muestra la cantidad de proteína y de unidades de actividad proteolítica, presentes en el volumen de 20 ml del extracto semipurificado de látex de chamburo, con el que se realizó la cromatografía.

Tabla 3.22. Contenido de proteína y unidades de actividad proteolítica en el extracto semipurificado de látex de toronche (*V. stipulata*)

Parámetro	Valor
Contenido de proteína (mg)	32,49
Actividad proteolítica (U)	6,22

Con base en esta información, se determinó el rendimiento en contenido de proteína y en actividad proteolítica, así como el grado de purificación en las fracciones resultantes de la cromatografía, con respecto al extracto semipurificado de látex de toronche. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 3.23.

No se incluyen las fracciones cuyo rendimiento en actividad proteolítica fue cero.

Tabla 3.23. . Rendimientos en cantidad de proteína y en actividad proteolítica y grado de purificación de las fracciones resultantes de la cromatografía de filtración en gel del extracto semipurificado de látex de toronche (*V. stipulata*)

Fracción	Rendimiento en proteína (%)	Rendimiento en actividad proteolítica (%)	Grado de purificación (veces)
10	0,55	0,03	0,06
11	0,56	0,03	0,06
12	0,66	0,03	0,05
13	0,79	0,07	0,09
14	0,83	0,07	0,08
15	0,40	0,03	0,09
18	0,44	0,03	0,08
19	1,65	0,34	0,21
20	6,71	1,35	0,20
21	10,32	6,94	0,67
22	13,37	13,89	1,04
23	14,22	15,57	1,09
24	14,44	22,32	1,55
25	13,48	14,51	1,08
26	8,33	10,14	1,22
27	5,07	1,24	0,24
28	1,74	0,31	0,18
29	1,39	0,17	0,12
30	0,70	0,03	0,05
TOTAL	97,95%	87,12%	-

El pico de rendimiento en actividad proteolítica, coincide con el pico de rendimiento en proteína, y se extiende de la fracción 22 a la 25. El rendimiento total en cantidad de proteína fue del 97,95% y en actividad, del 87,12%. Estos valores muestran que la cromatografía de filtración en gel, permitió purificar el extracto de látex de toronche y, además, que el método utilizado para la medición de la actividad proteolítica en las fracciones resultantes, fue adecuado.

Finalmente, se formó un lote con las fracciones 19 a la 28 y con él, se llevó a cabo una cromatografía de intercambio iónico.

3.6.2. PURIFICACIÓN CROMATOGRÁFICA POR INTERCAMBIO IÓNICO, CON RESPECTO A LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

Se realizó una cromatografía de intercambio iónico, mediante el procedimiento descrito en el acápite 2.2.9, del lote formado por las fracciones más activas de la filtración en gel.

La Tabla 3.24 presenta los valores de concentración proteica, de actividad proteolítica y de actividad proteolítica específica, en las fracciones obtenidas, excepto las que presentaron una actividad proteolítica igual a cero.

Tabla 3.24. Concentración de proteína y actividades proteolítica y proteolítica específica en las fracciones recolectadas de la cromatografía de intercambio iónico del extracto de látex de toronche (*V.stipulata*) purificado por filtración en gel

Fracción	Concentración proteica (mg/ml)	Actividad proteolítica (mU/ml)	Actividad proteolítica específica (mU/mg)
8	0,112	3,564	31,90
9	0,511	33,186	65,00
10	0,867	55,585	64,09
11	1,141	99,003	86,76
12	1,244	191,009	153,49
13	1,196	240,630	201,12
14	1,061	285,082	268,77
15	0,955	258,364	270,54
16	0,750	254,545	339,59
17	0,322	45,818	142,32
18	0,154	10,182	66,00
19	0,096	5,091	52,98
20	0,040	1,273	31,63
28	0,199	6,364	32,00
29	0,193	6,364	32,95
30	0,059	1,273	21,71
36	0,089	1,273	14,38
37	0,063	1,273	20,13

Las fracciones 1 a la 6 correspondieron al lavado con tampón fosfato 50 mM y pH 7,5, luego de la alimentación de la muestra. Las fracciones 7 a la 24 correspondieron a la elución con gradiente de concentración, desde 50 mM hasta 200 mM; mientras que, las fracciones 25 a la 33, a una elución con gradiente, desde 200 mM hasta 500 mM y las fracciones 34 a la 40, a un lavado con una solución tampón 500 mM y pH 7,5.

La concentración proteica más alta se encontró en la fracción 12 y la mayor actividad proteolítica en la fracción 14. La fracción más activa es la número 16, puesto que su valor de actividad proteolítica específica fue de 278,95 mU/mg.

En la Figura 3.7, se representan gráficamente los valores de concentración proteica y actividad proteolítica, frente al número de fracción.

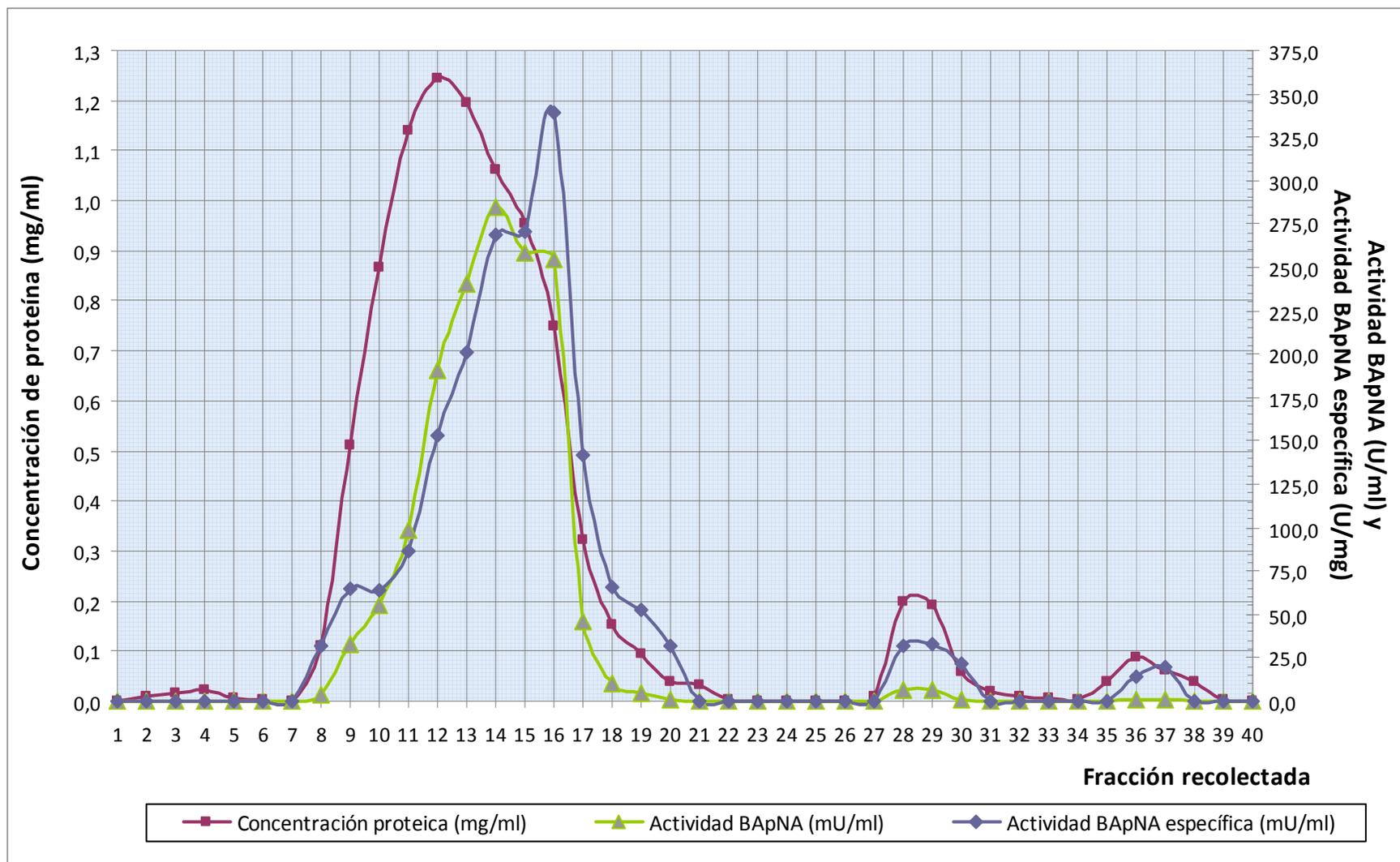


Figura 3.7. Concentración de proteína, actividades proteolítica y proteolítica específica contra número de fracción recolectada de la cromatografía de intercambio iónico del extracto de látex de toronche (*V. stipulata*) purificado por filtración en gel

El cromatograma muestra que el pico más pronunciado de concentración proteica, va de la fracción 7 a la 22. Mientras que, en cuanto a las actividades proteolítica y proteolítica específica, se observan picos superpuestos, que alcanzan los valores más altos entre la fracción 14 y la 16, es decir, se encuentran desplazados ligeramente hacia el lado derecho del valor máximo de concentración en proteína.

Los parámetros de referencia, para evaluar este proceso cromatográfico de purificación, fueron la cantidad de proteína y el número de unidades de actividad proteolítica en el lote formado por las fracciones más activas de la cromatografía de filtración en gel. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 3.25.

Tabla 3.25. Contenido de proteína y unidades de actividad proteolítica en el extracto de látex de toronche (*V. stipulata*) purificado por cromatografía de filtración en gel

Parámetro	Valor
Contenido de proteína (mg)	30,14
Actividad proteolítica (U)	4,15

Se procedió a determinar el rendimiento en cantidad de proteína y en actividad proteolítica, así como el grado de purificación en las fracciones resultantes de la cromatografía, con respecto al extracto de látex de toronche, purificado por filtración en gel. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 3.26. No se incluyen las fracciones cuyos rendimientos en actividad proteolítica fueron cero.

Tabla 3.26. Rendimientos en cantidad de proteína y en actividad proteolítica y grado de purificación en las fracciones recolectadas de la cromatografía de intercambio iónico del extracto de látex de toronche (*V. stipulata*) purificado por filtración en gel

Fracción	Rendimiento en proteína (%)	Rendimiento en actividad proteolítica (%)	Grado de purificación (veces)
8	1,11	0,25	0,22
9	5,08	2,31	0,46
10	8,63	3,87	0,45
11	11,36	5,90	0,61
12	12,38	12,31	1,07
13	11,91	15,77	1,41
14	10,56	18,87	1,88
15	9,50	17,01	1,89
16	7,46	16,74	2,38
17	3,20	3,19	1,00
18	1,54	0,71	0,46
19	0,96	0,35	0,37
20	0,40	0,09	0,22
28	1,98	0,44	0,22
29	1,92	0,44	0,23
30	0,58	0,09	0,15
36	0,88	0,09	0,10
37	0,63	0,09	0,14
TOTAL	91,72%	89,79%	-

Los mayores rendimientos en proteína se encuentran entre la fracción 11 y la 14, mientras que, el mayor rendimiento en actividad proteolítica se ubica entre la fracción 13 y la 16.

Los parámetros de evaluación obtenidos muestran que, a través de la cromatografía de intercambio iónico, se obtuvieron fracciones más activas y con mayor grado de pureza, que el lote formado por las fracciones más activas de la filtración en gel.

Para realizar la caracterización cinética con BApNA como sustrato, se eligió la fracción 16, por ser la que presentó el mayor grado de purificación, con un valor de 2,38 veces.

3.7. CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA FRACCIÓN MÁS ACTIVA DE LÁTEX DE TORONCHE (*V. stipulata*), PURIFICADA POR CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

La determinación de la actividad proteolítica con BApNA como sustrato, fue el método elegido para la caracterización cinética, debido a que se obtuvieron mejores resultados en cuanto a actividad, rendimiento en actividad y grado de purificación, que con los otros métodos. Además el procedimiento correspondiente, que se describe en el acápite 2.2.7.3, permite una optimización de tiempo y una reducción de la pérdida de muestra activa en cada ensayo.

Entonces, se llevó a cabo la caracterización cinética de la fracción más activa del proceso de purificación del extracto de látex de toronche, de acuerdo a los procedimientos descritos en la sección 2.2.11.

3.7.1. EFECTO DEL pH

Con el fin de determinar el efecto del pH sobre la reacción de hidrólisis de BApNA, catalizada por la fracción más activa de látex de toronche, se midió su actividad proteolítica, a valores de pH comprendidos entre 5,5 y 10,5 y a temperatura ambiente.

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3.28 y en la Figura 3.8. Se observa que la actividad proteolítica es menor en ambos extremos del rango de pH con el que se realizaron los ensayos, mientras que, dicha actividad se incrementa a valores de pH neutro.

Tabla 3.27. Actividad proteolítica con BApNA de la fracción más activa de látex de toronche (*V. stipulata*), purificada por intercambio iónico, a diferentes valores de pH

pH	Actividad proteolítica (U/ml)
5,5	16,67
6,5	51,67
7,5	59,17
8,5	43,33
9,5	33,33
10,5	5,83

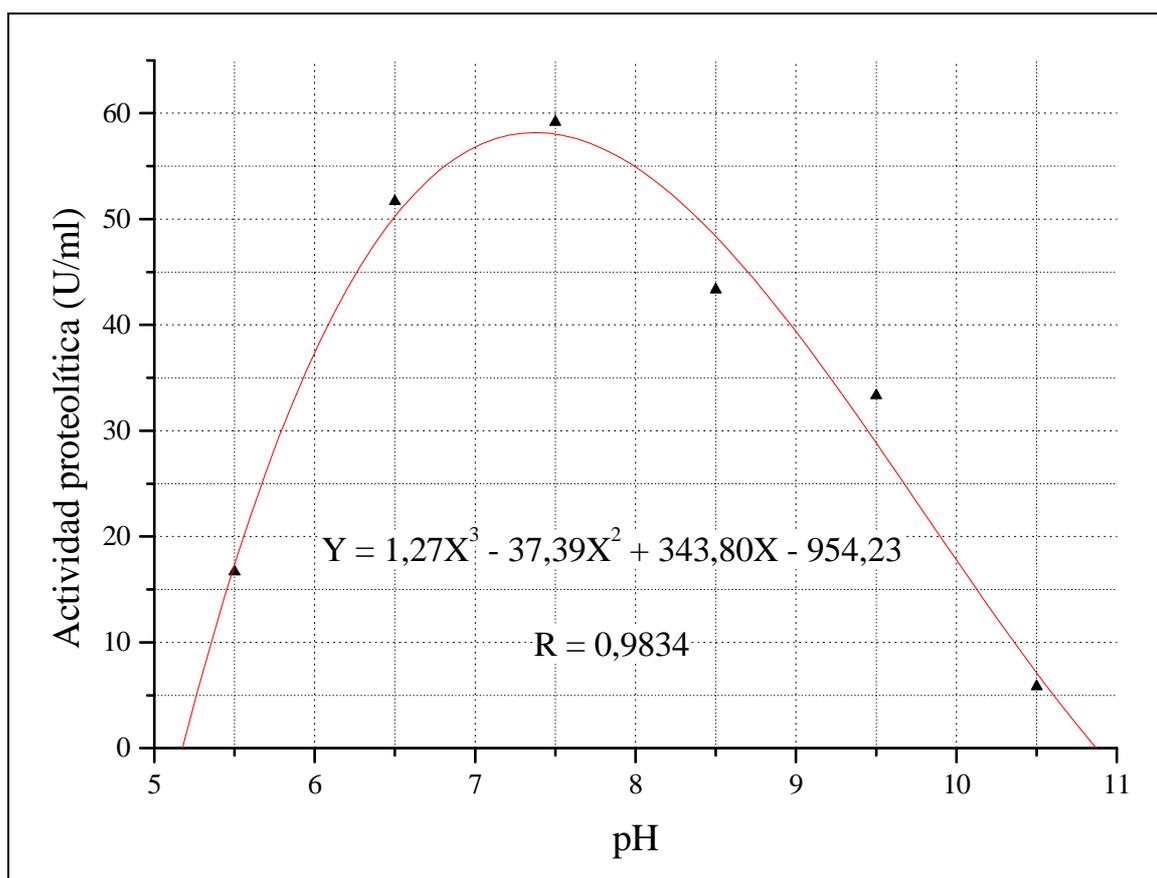


Figura 3.8. Actividad proteolítica con BApNA contra pH, en la fracción más activa de l extracto de látex de toronche (*V. stipulata*), purificada por intercambio iónico

El pH óptimo para la actividad proteolítica con BApNA, de la fracción más activa de látex de toronche, determinado experimentalmente fue 7,0. Esto es congruente con las características de las cisteíno proteinasas, que se describen en la sección 1.3.2, entre las cuales se encuentra la papaína, obtenida del látex de la papaya, cuyo pH óptimo está entre 6 y 7 (Worthington, 2 008).

El valor del coeficiente de correlación r , para la regresión polinómica de orden 3 que se realizó en el programa Microcal Origin 5.0, fue de 0,983.

Para los próximos ensayos, se mantuvo un pH de 7,0 en el tampón utilizado para la mezcla de reacción que permite determinar la actividad proteolítica con BApNA.

3.7.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA

El efecto de la temperatura sobre la cinética de la reacción de hidrólisis de BApNA, catalizada por las proteasas presentes en la fracción más activa de látex de toronche, fue determinada mediante ensayos realizados a diferentes temperaturas, en el rango entre 20° y 70° C. La Tabla 3.29 y la Figura 3.9 muestran los valores de actividad proteolítica con BApNA, obtenidos para cada temperatura de trabajo.

Tabla 3.28. Actividad proteolítica con BApNA de la fracción más activa de látex de toronche (*V. stipulata*), purificada por intercambio iónico, a diferentes temperaturas

Temperatura (° C)	Actividad proteolítica (U/ml)
20,0	34,83
30,0	51,33
37,5	71,50
40,0	79,44
60,0	62,33
70,0	27,68

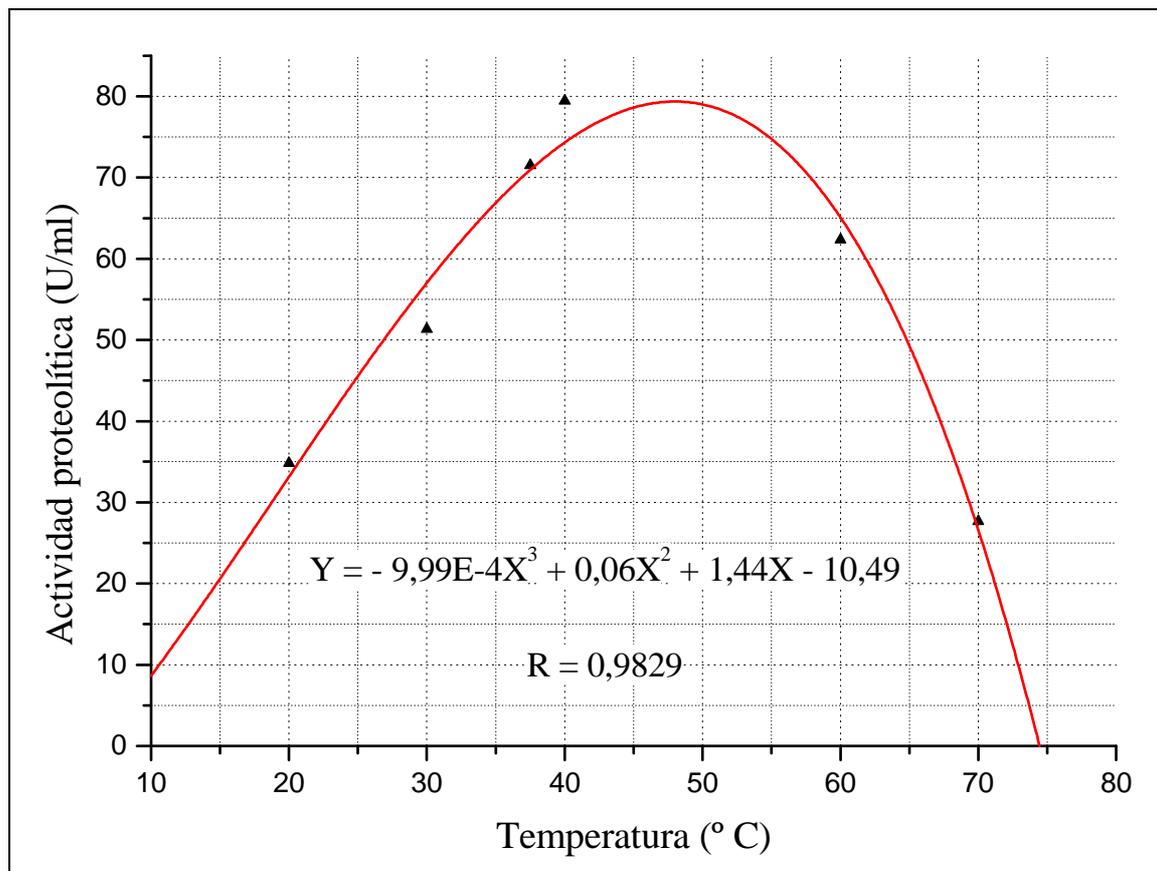


Figura 3.9. Actividad proteolítica con BApNA contra temperatura, en la fracción más activa de látex de toronche (*V. stipulata*), purificada por intercambio iónico

Los resultados muestran que, en las temperaturas de los extremos del rango de trabajo, se presentaron los valores más bajos de actividad proteolítica.

La actividad proteolítica de la fracción seleccionada, se incrementa conforme la temperatura aumenta, hasta los 50° C, donde alcanza su valor máximo. Desde ese punto, comienza a descender, hasta alcanzar un valor de 27,68 U/ml, a los 70° C, debido a la desnaturalización que experimentan las enzimas por efecto de la temperatura. Este comportamiento está dentro de lo esperado para las reacciones catalizadas por enzimas, que se explica en el acápite 1.4.6.3.

3.7.3. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL SUSTRATO. CÁLCULO DE K_M Y $V_{m\acute{a}x}$

Para determinar el efecto de la concentración del sustrato sobre la actividad proteolítica, se realizaron varios ensayos, en los que se trabajó a pH 7,0 y a 50° C y como sustrato para las distintas mezclas de reacción, se utilizaron soluciones de BApNA en DMF, en concentraciones entre 1 y 10 mg/ml.

La Tabla 3.30 presenta los valores de la actividad proteolítica obtenidos para cada concentración de sustrato.

Tabla 3.29. Actividad proteolítica con BApNA de la fracción más activa de látex de toronche (*V. stipulata*), purificada por intercambio iónico, a diferentes concentraciones de sustrato

Concentración de sustrato		Actividad BApNA (U/ml)
mg/ml	mM	
1	0,192	13,33
3	0,575	35,67
5	0,958	59,67
7	1,341	70,33
9	1,725	74,67
10	1,916	81,00

La Figura 3.10 fue realizada en el programa Microcal Origin 5.0 (1 997) mediante una regresión hiperbólica con los datos obtenidos. En la misma, se determinaron los valores de los parámetros cinéticos K_M y $V_{m\acute{a}x}$.

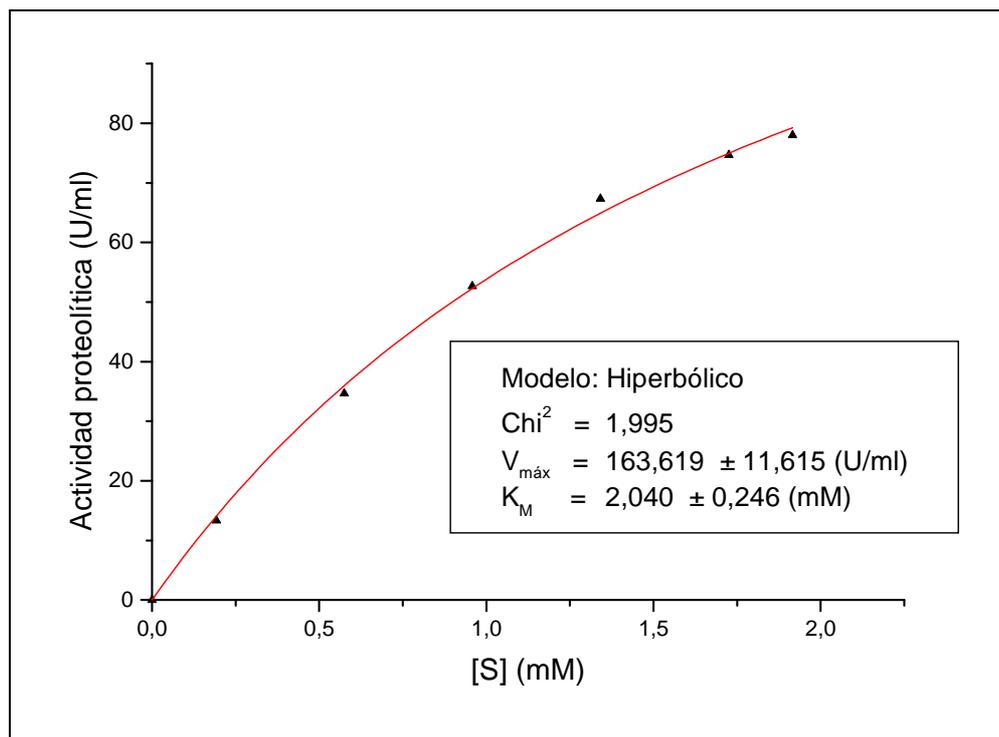


Figura 3.10. Actividad proteolítica con BApNA contra concentración de sustrato de la fracción más activa de látex de toronche (*V. stipulata*), purificada por intercambio iónico

En la gráfica se observa que, inicialmente, el incremento en la actividad proteolítica es casi lineal, hasta una concentración de sustrato de aproximadamente 1,0 mM. Luego, la actividad continúa aumentando, pero de una manera menos pronunciada, lo cual indica que se acerca asintóticamente a su valor máximo.

La curva se ajusta al modelo cinético de Michaelis y Menten, descrito en el acápite 1.4.7.1. Por este motivo, se aceptan como válidos los valores obtenidos de K_M y $V_{m\acute{a}x}$, que son 2,04 mM y 163,62 U/ml, respectivamente.

El valor de K_M refleja que existió una afinidad relativamente alta de las enzimas presentes en la fracción purificada de látex de toronche, por el sustrato. Dicho valor es comparable con el K_M de la quimotripsina para la N-benzoiltirosinamida, que es igual a 2,5 mM y con dicho parámetro de la β -galactosidasa, para el sustrato lactosa, cuyo valor es de 4,0 mM, (Boyer, 2 000).

El número de recambio, K_3 , calculado mediante la Ecuación 1.9, tiene un valor de 212,27 U/mg; es decir, 212,27 μ moles de BApNA degradado por miligramo de enzima, por minuto.

Finalmente, en la Tabla 3.30, se presenta un resumen de los valores de volumen, cantidad de proteína, actividad proteolítica con BApNA, rendimientos y grado de purificación, obtenidos en cada etapa del proceso de purificación, del extracto correspondiente al látex de toronche.

Tabla 3.30. Resumen de los parámetros de concentración proteica y de actividad proteolítica en BApNA, obtenidos en el proceso de purificación del extracto acuoso de látex de toronche (*Vasconcella stipulata*)

Etapa	Volumen (ml)	Concentración de proteína (mg/ml)	Actividad proteolítica (mU/ml)	Actividad específica (mU/mg)	Grado de purificación (veces)	Rendimiento en proteína (%)	Rendimiento en actividad (%)
Extracto acuoso	20	3,50	387,71	110,77	1,00	100,00	100,00
Extracto semipurificado	20	1,71	327,27	191,40	1,73	48,86	84,41
Lote seleccionado - cromatografía de filtración en gel	20	1,51	215,24	142,81	1,29	43,14	55,52
Fracción más activa - cromatografía de filtración en gel	3	1,50	413,77	276,58	2,50	6,43	16,01
Fracción más activa - cromatografía de intercambio iónico	3	0,75	254,55	339,59	3,07	3,21	8,48

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES

1. Se lograron obtener muestras de látex en polvo, con actividad proteolítica presente en ellas. Los látex fueron extraídos de frutos verdes de las tres especies del género *Vasconcella* seleccionadas para el estudio, el toronche (*Vasconcella stipulata*), el chamburo (*Vasconcella cundinamarcencis*) y la col de monte (*Vasconcella monoica*).
2. La actividad proteolítica de las muestras de látex seco, obtenidas mediante el secado en estufa a 40° C de los látex fluidos que se extrajeron, solamente disminuyó en un rango entre 1,09% y 1,69%, luego de tres semanas de almacenamiento en congelación.
3. Las proteasas presentes en las muestras de látex en polvo, se solubilizaron al preparar extractos acuosos, con una solución tampón fosfato diácido de sodio 50 mM y pH 7,5. En dichos extractos, se encontraron actividades caseinolítica, esterásica y proteolítica con BApNA.
4. Mediante la purificación primaria, por adición de etanol al 96%, se alcanzaron rendimientos en proteína de 52,84%; 57,03% y 52,90%; en actividad caseinolítica de 75,83%; 75,10% y 73,68% y en actividad esterásica de 60,87%; 75,38% y 60,61%, para las muestras de toronche (*V. stipulata*), chamburo (*V. cundinamarcencis*) y col de monte (*V. monoica*), respectivamente.
5. Los grados de purificación, con respecto a la actividad caseinolítica, obtenidos en los extractos semipurificados de látex de toronche, chamburo y col de monte fueron de 1,44; 1,31 y 1,39 veces, respectivamente. Mediante la purificación primaria, se obtuvieron extractos con mayores concentraciones de proteasas activas, al eliminar otros compuestos presentes en los extractos acuosos.

6. El extracto semipurificado más activo, fue el correspondiente al látex de toronche (*V. stipulata*), el cual presentó una actividad caseinolítica específica de 41,87 U/mg, una actividad esterásica específica de 148,28 mU/mg y actividad proteolítica específica de 191,40 mU/mg. Presentó un grado de purificación de 1,73 veces, con respecto a la actividad proteolítica. Este extracto fue seleccionado para continuar con el proceso de purificación.
7. El lote formado por las fracciones más activas de la purificación cromatográfica por filtración en gel, tuvo un grado de purificación de 1,29 veces, con respecto a la actividad proteolítica; un rendimiento en proteína de 43,14% y un rendimiento en actividad de 55,52%.
8. La fracción más activa de la cromatografía de intercambio iónico, llevada a cabo con el lote de las fracciones más activas de la purificación por filtración en gel, presentó una actividad proteolítica de 254,55 mU/mg, un rendimiento en proteína de 3,21%, un rendimiento en actividad de 8,48% y un grado de purificación de 3,07 veces.
9. La determinación de la actividad proteolítica con BApNA, fue el método con el que se obtuvieron los mejores resultados, en la evaluación de los procesos de purificación. Esto es confirmado por los valores de rendimiento en actividad, actividad específica y grado de purificación obtenidos en cada etapa del proceso.
10. El pH óptimo para la fracción más activa, correspondiente al látex de toronche, fue 7,0, mientras que la temperatura óptima fue 50° C. La cinética enzimática de esta fracción se ajustó al modelo de Michaelis – Menten y los valores de las constantes cinéticas K_M y $V_{m\acute{a}x}$ fueron 2,04 mM y 163,62 U/ml, respectivamente.

4.2. RECOMENDACIONES

1. Complementar esta investigación con una electroforesis y una zimografía, que permitan determinar qué enzimas estarían presentes en las fracciones más activas obtenidas, de acuerdo con sus pesos moleculares y, cuáles de ellas son proteasas.
2. Estudiar con mayor profundidad el mecanismo de acción de las enzimas proteolíticas encontradas, con el fin de determinar a qué familia pertenecen, dentro de las proteasas.
3. Investigar los usos potenciales de las proteasas aisladas y purificadas del látex de frutos de plantas del género *Vasconcella*, en las industrias en las que actualmente se emplean otras enzimas proteolíticas, como la papaína o la bromelina.
4. Investigar la posibilidad de utilizar las enzimas proteolíticas obtenidas, en la quimionucleólisis, que es una aplicación biomédica de la quimiopapaína, para el tratamiento de hernias discales.
5. Llevar a una escala piloto, las investigaciones acerca de las fitoproteasas que se han desarrollado dentro del proyecto PIC – 111.
6. Como investigación complementaria, se podría obtener una presentación comercializable y de grado alimentario, del complejo enzimático presente en el látex de los frutos de las plantas del género *Vasconcella*. En dicho estudio, se determinaría, además, la factibilidad de una producción a nivel industrial.

BIBLIOGRAFÍA

1. ALCAYAGA, O., 2 004, "Influencia del método de deshidratado y época de extracción en la actividad enzimática del látex de papayo cultivado en Cobquecura VIII Región Chile", Memoria de Título para optar al Título de Ingeniero Civil Agrícola, Universidad de Concepción, Chile. <http://www.bibliodigital.udec.cl/sdx/UDEC/rsimple-filtree.xsp?q=papayo&base=documents>, (Noviembre, 2008)
2. ÁLVARO, T., UZCÁTEGUI, E. y MUÑOZ, R., 2 002, "Investigación de una proteasa aislada de babaco *Carica pentagona H.*", *Politécnica*, 23 (1), 57.
3. AYALA, P., 2 005, "Enzimología, aislamiento, purificación y cuantificación", Universidad de Sonora, México. <http://payala.mayo.uson.mx/Programa/programa.htm>, (Abril, 2 008)
4. BASTIDAS, K., 2 005, "Estudio preliminar de la obtención de la enzima aminoacilasas I a partir de vísceras de cuy, pollo y res", Proyecto de Titulación previo a la obtención del Título de Ingeniero Químico, Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador, pp. 24-34, 38-42, 49-56, 158-159
5. BOYER, R., 2 000, "Conceptos en Bioquímica", International Thomson Editores, México, pp. 141-168
6. BRENDA, 2 007, "Entry of chymopapain (EC-Number 3.4.22.6)" http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=3.4.22.6, (Febrero, 2 008)
7. BRENDA, 2 007, "Entry of Stem bromelain (EC-Number 3.4.22.32)" http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=3.4.22.32, (Febrero, 2 008)
8. BRENDA, 2 007, "Entry of ficain (EC-Number 3.4.22.3)" http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=3.4.22.3, (Febrero, 2 008)
9. CABALLERO, J., BLANCO, J. Y MOYANO, E., 2 008,"13. Cromatografía de filtración en gel", Universidad de Córdoba, España, <http://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs>, (Febrero, 2 008)
10. CALVO, J., 2 003, "Precipitación por desnaturalización selectiva", Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina. <http://www.qb.fcen.uba.ar/quimicabiologica/>, (Enero, 2 008)

11. CAMPOS, G., 2 001, "Efectos de la atmosfera iónica en la estabilidad cinética de la quimopapaína", Tesis previa a la obtención del grado de Maestro en Ciencias, de la Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F.
<http://biblio.iztapalapa.uam.mx/tesis/UAM4267.pdf> (Enero, 2 008)
12. CARRETERO, M., 2 004, "Papayero y Papaínas". <http://www.portalfarma.com/>, (Febrero, 2 008)
13. CASAMAYOR, A. y GONZÁLEZ, A., 2 008 , "Seminarios de Bioquímica II", Departamento de Bioquímica y Biología Molecular".
http://minnie.uab.es/~veteri/21207/SB1_analisis_enzimatico_2008.ppt
(Enero, 2 008)
14. CIRAD-FLHOR/IPGRI, 2 000, "Vasconcellea Species", Project for Neotropical Fruits, http://www.ciat.cgiar.org/ipgri/fruits_from_americas/frutales/species%20Vasconcella.htm, (Octubre, 2 007)
15. CORPEI, 2 006, "Perfiles de producto: Babaco", Centro de Inteligencia Comercial – CICO. http://200.110.94.59/productos_down/perfil_de_babaco_2005756.pdf, (Noviembre, 2 007)
16. CHÁVEZ, M., 1 990, "Temas de enzimología", 2, ENPES, La Habana, pp. 25-30, 35-39, 60-63.
17. DHUIQUE-MAYER, C., CARO, Y., PINA, M., RUALES, J., DORNIER, M. y GRAILLE, J., 2 004 "Biocatalytic properties of lipase in crude latex from babaco fruit (*Carica pentagona*)", Springer Netherlands, <http://www.springerlink.com/content/?k=babaco> , (Noviembre, 2 007)
18. FÉLIX, R., 2 008, "Aislamiento, purificación y caracterización de proteasas de origen vegetal, a partir de muestras de hierba mora (*Solanum nigrum*) e higuera (*Ficus apollinaris*)", Proyecto de Titulación previo a la obtención del Título de Ingeniero Químico, Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador. pp. 11-20, 30-42, 48-49.
19. GIOVE, R., 1 996, "Medicina tradicional en el tratamiento de enteropatosis", Revista de Gastroenterología del Perú, 16 (3), 12.
20. GLIBOTA, G., GARRO, O., JUDIS, M., 2 000, "Actividad proteolítica de restos del fruto de *Carica papaya*", Comunicaciones científicas y Tecnológicas.
<http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt/2001/cyt.htm>, (Marzo, 2 008)
21. GÓMEZ, A., 2 002, "Estudio de la relación parásito - hospedador en trypanosomatídeos de plantas", Trabajo especial de grado como requisito parcial para optar al Título de Licenciada en Biología, Universidad de los

- Andes, Mérida, Venezuela, <http://www.sigmaaldrich.com/us-export.html>, (Enero, 2 008)
22. GÓMEZ, C., 2 008, "Identificación de la actividad proteolítica en especies vegetales comunes presentes en las provincias de Loja y Pastaza", Proyecto de Titulación previo a la obtención del Título de Ingeniero Químico, Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador. pp. 33-39, 50-51, 54-60.
23. GONZÁLEZ, J., 2 004, "Tema 11: Enzimas ", Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad del País Vasco, España, <http://www.ehu.es/biomoleculas/enzimas/tema11.htm>, (Noviembre 2 007)
24. GRACIA, J., 2 008, "Electroforesis", Facultad de Química, Departamento de Programas Audiovisuales, UNAM, México, <http://depa.pquim.unam.mx/proteinas/estructura/EPpage.html>, (Marzo, 2 008)
25. GRUDKOWSKA, M. y ZAGDAŃSKA, B., 2 004, "Multifunctional role of plant cysteine proteinases", Acta Biochimica Polónica, Polonia, 51(3), http://www.actabp.pl/pdf/3_2004/609s.pdf, (Marzo, 2 008)
26. HERNÁNDEZ, M., 2 005, "Proceso de obtención de bromelina a partir de tallos de piña", Revista CENIC, Ciencias Biológicas, 36, No. Especial <http://revistas.mes.edu.cu:9900/EDUNIV/>, (Diciembre, 2 007)
27. HERNÁNDEZ, R., 2 007, "Cómo extraer la Enzima Papaína de las Papayas, Usos medicinales de Papaína de las Papayas", Tecnologic Farm S.A., Servicios Agrícolas y Agroindustria, Chile, <http://seragro.cl/?a=642>, (Mayo, 2 008)
28. JIMÉNEZ, J., 2 002, "Manual práctico para el cultivo de papaya", Editorial Earth, Guácimo, Costa Rica, <http://usi.earth.ac.cr/glas/sp/90022688.pdf>, (Septiembre, 2 008)
29. KOOLMAN, J. y ROEHM, K., 2 005, "Color Atlas of Biochemistry", Segunda edición, Thieme, Stuttgart, New York, U.S.A., pp. 80-120.
30. KYNDT, T., ROMEIJN-PEETERS, E., VAN DROOGENBROECK, B., ROMERO-MOTOCHI, J., GHEYSEN, G. y GOETGHEBEUR, P., 2 005, "Species relationships in the genus *Vasconcellea* (*Caricaceae*) based on molecular and morphological evidence", Department of Molecular Biotechnology, Faculty of Bioscience Engineering, Universiteit Gent, Bélgica, <http://www.amjbot.org/cgi/content/full/92/6/1033?ck=nck>, (Noviembre, 2 007)
31. MARCILLO, V., 2 005, "Efecto de dos tipos alternativos de secado en la actividad enzimática del látex de babaco", Proyecto de Titulación previo a la

- obtención del Título de Ingeniera Química, Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador, pp. 5, 26, 31-39, 44,66.
32. MARTÍNEZ, R., y CORTÉS, R., 2 009, “Alimentos funcionales y naturales”, Revista Énfasis Alimentación Online, <http://www.alimentacion.enfasis.com/notas/11928-alimentos-funcionales-y-naturales>, (Febrero, 2 009)
33. Mc CORMACK, L., 2 007, “La Química en las Ciencias de la Salud”, Universidad Nacional del Comahue, Argentina, <http://essa.uncoma.edu.ar/academica/materias/morfo/ARCHIVOPDF6/>, (Enero, 2 009)
34. MEDINA, M., 2 005, “Técnicas cromatográficas de uso general para la separación de mezclas proteicas”, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, España, http://www.unizar.es/departamentos/bioquimica_biologia/docencia/FMBvirtual/PurProt/Croma.htm, (Enero 2 008)
35. MONTIEL, A., 2 005, “Identificación de la enzima responsable de la degradación de pentaclorofenol (PCF) en *Amylomyces rouxii* y optimización del mecanismo de degradación mediante la expresión heteróloga de peroxidasas”, Tesis para obtener el grado de Doctor en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, México, <http://biblio.iztapalapa.uam.mx/tesis/UAMI11934.pdf>, (Febrero, 2 008)
36. MORA, K., 2 004, “Rendimiento y actividad enzimática de latex de papayo, *Vasconcella cundinamarcensis* V. Badillo (Caricaceae), cultivado en Cobquecura, VIII Región, Chile”, Memoria de Título para optar al Título de Ingeniero Civil Agrícola, Universidad de Concepción, Chile, <http://www.bibliodigital.udec.cl/sdx/UDEC/rsimple-filtree.xsp?q=papayo&base=documents>, (Enero, 2 009)
37. NOVOA, M., 2 005, “Obtención de un sustituto vegetal de la renina para la elaboración de quesos”, Proyecto de Titulación previo a la obtención del Título de Ingeniera Química, Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador, pp. 101-102.
38. NÚÑEZ, F., 2 007, “Identificación de proteasas vegetales con posibles aplicaciones industriales o biomédicas, a partir de especies comunes de las provincias de Bolívar y Pichincha”, Proyecto de Titulación previo a la obtención del Título de Ingeniera Química, Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador, pp. 24-33, 41-42.
39. NÚÑEZ, C., 2 008, “En relación al secado y a los desecadores”, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones, Argentina, <http://www.cenunez.com.ar/>, (Noviembre, 2 008)

40. REINA, M., 2 003, "Cromatografía", Departamento de Biología Celular, Universidad de Barcelona, España, <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/cromatografia.htm>, (Enero, 2 008)
41. REYES, M., BLOM, H., CARLSSON, J. y RUALES, J., 2 005, "Determinación de glicosidas en el babaco (*Vasconcellea* × *Heilbornii* cv. 'Babaco'), Aislamiento y caracterización de la α -manosidasa del látex de babaco", DECAB, Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador, <http://www.encb.ipn.mx/cibia/Tom0III/III-04.pdf>, (Diciembre, 2 007)
42. RIGNANESE, L., 2 006, "Botánica Sistemática", http://www.homolaicus.com/scienza/erbario/utility/botanica_sistemica/hypertext/2025.htm, (Marzo, 2 008)
43. ROBLES, A., 2 001, "La Papaya (*Carica papaya*)", Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, México, http://www.cucba.udg.mx/new/informacionacademica/coaxican/plts_mex/papaya.htm, (Noviembre, 2 007)
44. ROWAN, A., BUTTLE, D. y BARRETT, A., 1 990, "The cysteine proteinases of the pineapple plant" Department of Biochemistry, Strangeways Research Laboratory, Cambridge, United Kingdom., 266(3), <http://www.pubmedcentral.nih.gov/>, (Diciembre, 2 007)
45. SCHELDEMAN, X., 2 002, "Distribution and Potential of Cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) and Highland Papayas (*Vasconcellea* spp.) in Ecuador", Thesis submitted in fulfilment of the requirement for the degree of Doctor (Ph.D.) in Applied Biological Sciences, Universiteit Gent, Bélgica, <http://www.tropicallab.ugent.be/xavierphd.pdf>, (Octubre 2 008)
46. SCHELDEMAN, X., ROMERO-MOTOCHE, J., VAN DAMME, V. y HEYENS, V., 2 003, "Potential of highland papayas (*Vasconcella* spp.) in southern Ecuador", [http://www.lyonia.org/Archives/Lyonia%205\(1\)%202003\(1-100\)/](http://www.lyonia.org/Archives/Lyonia%205(1)%202003(1-100)/), (Octubre, 2 007)
47. SCHELDEMAN, X. y VAN DAMME, P., (2 005), "Vasconcella", <http://www.tropicallab.ugent.be/vasconcella1.htm>, (Octubre, 2 007)
48. SIGMA-ALDRICH CO., 2 008, "Papain", <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/papain.html>, (Marzo, 2 008)
49. UNIVERSIDAD DE CARABOBO, 2 006, "Tema 7. Enzimas", Facultad Experimental de Ciencias y Biología, http://www.facyt.uc.edu.ve/quimica/pensum/cuarto/gg0478/2006/tema_enzimas.ppt, (Octubre, 2 007)

50. UNIVERSIDAD DE LA HABANA, 2 008, "Clase práctica, ensayos enzimáticos", Facultad e Biología, La Habana, Cuba, http://fbio.uh.cu/enzimol/clases_practicas/, (Enero 2 009)
51. UNIVERSIDAD NACIONAL DE COSTA RICA, 2 007, "Cinética enzimática: Efecto de la concentración de sustrato sobre una enzima" Escuela de Medicina Veterinaria, Costa Rica, <http://www.medvet.una.ac.cr/>, (Febrero, 2 008)
52. UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE, 2 008, "Cinética enzimática: determinación espectrofotométrica de la constante de Michaelis-Menten de la papaína", Prácticas de Termodinámica y Cinética-2º curso Licenciatura de Biotecnología, http://www.upo.es/depa/webdex/quimfis/docencia/biotec_termo/Practica5TyCQ0506.pdf, (Septiembre, 2 008)
53. UNIVERSITY OF GÖTEBORG, "Flora of Ecuador", Department Of Systematic Botany, Editado por Gunnar Harling, (20), pp. 32, 34, 36, 38, 40, 42.
54. VÉLEZ, A., 2 006, "Cromatografías de Columna ", Departamento de Biología, Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, Puerto Rico, <http://www.uprm.edu/biology/profs/velez/cromatografias.htm>, (Enero, 2 008)
55. WORTHINGTON BIOCHEMICAL CORPORATION, 2 008, "Papain, I.U.B.: 3.4.22.2", New Jersey, U.S.A., <http://www.worthington-biochem.com/pap/default.html>, (Marzo, 2 008)
56. YÁÑEZ, M., 2 006, "Análisis de las proteínas", Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, México, http://docencia.izt.uam.mx/lyanez/analisis/material_adicional/notasproteinas2.ppt, (Enero, 2 008)

ANEXOS

ANEXO A

Fotografías de las plantas del género *Vasconcella* de las que se recolectaron los frutos

<p>Nombre común: Chamburo</p> <p>Nombre científico: <i>Vasconcella cundinamarcensis</i></p> <p>Característica principal: Presencia de pubescencia en el envés de las hojas y ápice del tallo</p>	
---	---

Figura A.1. Fotografías y descripción de la planta de chamburo (*Vasconcella cundinamarcensis*), de la que se recolectaron los frutos para el estudio

Nombre común:

Col de monte

Nombre científico:*Vasconcella monoica***Característica principal:**

Son plantas monoicas, con 14 a 16 flores, de las cuales solamente la apical es femenina



Figura A.2. Fotografías y descripción de la planta de col de monte (*Vasconcella monoica*), de la que se recolectaron los frutos para el estudio

<p>Nombre común: Toronche</p> <p>Nombre científico: <i>Vasconcella stipulata</i></p> <p>Característica principal: Presencia de estípulas a los lados de las cicatrices foliares</p>	
--	---

Figura A.3. Fotografías y descripción de la planta de col de monte (*Vasconcella monoica*), de la que se recolectaron los frutos para el estudio

ANEXO B

Significancia de la diferencia entre los valores de actividad proteolítica obtenidos para las dos temperaturas de secado de látex utilizadas

La Figura B.1 muestra que, con un nivel de confianza del 95%, los valores de actividad caseinolítica en el látex de frutos de chamburo, secado a 40° C, presentan una diferencia significativa, con respecto a los valores obtenidos en el látex secado a 55° C. Se consideraron los valores promedio de las mediciones que se hicieron de cada una de las dos muestras preparadas, correspondientes a las dos temperaturas de secado.

Chamburo			
One-Way ANOVA on Secado a 40° C -> Secado a 55° C:			
Data	Mean	Variance	N
A	101,8	19,845	2
B	83,925	0,55125	2
F = 31,33082			
p = 0,03047			
At the 0,05 level,			
the means are significantly different.			

Figura B.1. Resultados obtenidos en el programa Microcal Origin 5.0, para los valores de actividad caseinolítica en látex de chamburo (*V. cundinamarencis*), secados a 40° C y a 55° C

La Figura B.2 muestra que, también existe diferencia significativa con un nivel de confianza del 95%, entre los valores de actividad caseinolítica en el látex de frutos de babaco secados a 40° C y a 55° C.

Babaco			
One-Way ANOVA on Secado a 40° C -> Secado a 55° C:			
Data	Mean	Variance	N
A	36,09	1,0082	2
B	29	0,02	2

F = 97,77884			
p = 0,01007			

At the 0,05 level,			
the means are significantly different.			

Figura B.2. Resultados obtenidos en el programa Microcal Origin 5.0, para los valores de actividad caseinolítica en látex de babaco (*V. × heilbornii babaco*), secados a 40° C y a 55° C

ANEXO C

Significancia de la diferencia entre los valores obtenidos para la actividad proteolítica en látex fluido y en látex coagulado

La Figura C.1 muestra que, con un nivel de confianza del 95%, los valores de actividad caseinolítica en el látex fluido de frutos de chamburo, presentan una diferencia significativa, con respecto a los valores obtenidos en el látex coagulado. De manera similar al caso anterior, se consideraron los valores promedio de las mediciones que se hicieron para cada una de las dos muestras preparadas, correspondientes a los dos tipos de látex analizados.

Chamburo			
One-Way ANOVA on Látex fluido -> Látex coagulado:			
Data	Mean	Variance	N
A	101,8	19,845	2
B	79,46	0,5	2
F = 49,06125			
p = 0,01978			
At the 0,05 level, the means are significantly different.			

Figura C.1. Resultados obtenidos en el programa Microcal Origin 5.0, para los valores de actividad caseinolítica en látex fluido y en látex coagulado de chamburo (*V. cundinamarencis*)

Babaco			
One-Way ANOVA on Látex fluido -> Látex coagulado:			
Data	Mean	Variance	N
A	36,575	1,20125	2
B	29,625	0,36125	2

F = 61,8272
p = 0,01579

At the 0,05 level,
the means are significantly different.

Figura C.2. Resultados obtenidos en el programa Microcal Origin 5.0, para los valores de actividad caseinolítica en látex fluido y en látex coagulado de babaco (*V. × heilbornii babaco*)

ANEXO D

Ejemplos de cálculo para la determinación de concentración proteica, actividad caseinolítica, actividad esterásica, actividad proteolítica con BApNA y actividad específica

Concentración de proteína

Para determinar la concentración proteica (en mg/ml) de una muestra, se multiplicó el valor obtenido experimentalmente de la DO_{280} , por el factor de dilución empleado.

Por ejemplo, la DO_{280} del extracto acuoso de látex de chamburo fue de 0,317. Ese valor fue multiplicado por 10, debido a que fue necesario diluir 1 parte del extracto en 9 partes de la solución tampón, para poder realizar la lectura en el espectrofotómetro. Al reemplazar los datos en la Ecuación 2.1, se tiene:

$$[P] = \frac{DO_{280} \cdot \frac{f}{L}}{\varepsilon} = \frac{0,317 \cdot \frac{10}{1}}{1} = 3,17$$

Por tanto, la concentración de proteína en el extracto acuoso de látex de chamburo fue 3,17 mg/ml

Actividad caseinolítica

Para el cálculo de la actividad caseinolítica en el extracto acuoso de látex de col de monte, se realizaron las mediciones que se muestran en la Tabla D.1.

Tabla D.1. Datos experimentales de DO_{280} , para la determinación de la actividad caseinolítica en el extracto acuoso de látex de col de monte (*V. monoica*)

DO_{280}				
Muestra 1	Muestra 2	Blanco 1	Blanco 2	Delta promedio (h)
1,130	1,090	0,123	0,124	0,987

El valor h corresponde al promedio de las variaciones entre la DO_{280} de las muestras y la DO_{280} de los blancos. Al reemplazar h en la Ecuación 2.2, se tiene:

$$A_c = \frac{h}{(0,1)^2} = \frac{0,987}{(0,1)^2} = 98,65$$

Entonces, la actividad caseinolítica en el extracto acuoso de látex de col de monte fue 98,65 U/ml.

Actividad esterásica

Por ejemplo, para determinar la actividad esterásica en el extracto semipurificado de látex de toronche, se midió la DO_{348} de la mezcla de reacción, a los tres minutos, tanto para la muestra como para el blanco.

Al reemplazar los valores obtenidos en la Ecuación 2.3, se obtiene:

$$A_E = \frac{\Delta DO_{348}}{\Delta t} \cdot \frac{1000 \cdot V_c}{\varepsilon \cdot L \cdot V_e} = (0,007) \times \frac{1000 \times 2560}{5150 \times 1 \times 30} = 0,116$$

La actividad esterásica en el extracto semipurificado de látex de toronche fue de 0,116 U/ml.

Actividad proteolítica con BApNA

Para determinar la actividad proteolítica en la fracción 23 de la cromatografía de filtración en gel con el extracto semipurificado de látex de toronche, se midió la DO_{400} de la mezcla de reacción, a los tres minutos, tanto para la muestra como para el blanco.

Al reemplazar los valores obtenidos en la Ecuación 2.4, se obtiene:

$$A_B = \frac{\Delta DO_{400}}{\Delta t} \cdot \frac{1000 \cdot V_c}{\varepsilon \cdot L \cdot V_e} = (0,151) \times \frac{1000 \times 1200}{8800 \times 1 \times 100} = 0,309$$

La actividad proteolítica con BApNA en la fracción 23 fue 0,309 U/ml.

Actividad específica

La actividad específica puede ser determinada mediante la división de la actividad enzimática, para la concentración de proteína de una muestra. Por ejemplo, la actividad caseinolítica específica en el extracto acuoso de látex de chamburo sería:

$$A_{\text{esp}} = \frac{AE}{[P]} = \frac{38,23}{0,913} = 41,87$$

Por tanto, la actividad caseinolítica específica en el extracto semipurificado de látex de chamburo fue 41,87 U/mg.

ANEXO E

Ejemplos de cálculo para la determinación del grado de purificación y los rendimientos en proteína y en actividad, de un proceso de purificación

Rendimiento en proteína y rendimiento en actividad

Para determinar el porcentaje de rendimiento en proteína es necesario conocer el contenido de proteína (en mg) del extracto inicial y del extracto que se obtiene, luego del proceso de purificación que se desea evaluar.

De manera similar, para determinar el porcentaje de rendimiento en actividad, se deben conocer las actividades enzimáticas (en unidades enzimáticas) presentes en los extractos antes y después de la purificación.

Por ejemplo, para determinar los rendimientos en proteína y en actividad de la semipurificación por adición de etanol, del extracto de látex de toronche, se necesitan los datos que se encuentran en la Tabla E.1.

Tabla E. 1. Contenido de proteína y unidades de actividad BApNA en los extractos acuosos y semipurificado de látex de toronche

Parámetro	Extracto acuoso	Extracto semipurificado
Contenido de proteína (mg)	69,90	35,91
Actividad BApNA (U)	7,755	6,873

Al reemplazar los datos en la Ecuación 1.3, se tiene:

$$\% \text{ Rendimiento}_A = \frac{6,873\text{U}}{7,755\text{U}} \times 100 = 88,63\%$$

Por tanto, el rendimiento en actividad proteolítica con BApNA es del 88,63%

Al reemplazar los datos del contenido de proteína, en la Ecuación 1.4, se tiene:

$$\% \text{ Rendimiento}_p = \frac{35,91 \text{ mg}}{69,90 \text{ mg}} \times 100 = 51,37 \%$$

Entonces, el rendimiento en proteína del proceso de semipurificación por adición de etanol, es del 51,37%

Grado de purificación

Para determinar el grado de purificación, se debe relacionar la actividad específica de un extracto en una etapa del proceso, con la actividad específica en la primera etapa.

Por ejemplo, para determinar el grado de purificación, con respecto a la actividad caseinolítica, de la cromatografía de filtración en gel, para la fracción 17, se reemplazan los datos respectivos en la Ecuación 1.5. La actividad caseinolítica específica del extracto semipurificado de toronche es 69,59 U/mg, mientras que en la fracción 17 es 82,94 U/mg:

$$GP = \frac{82,94 \text{ U/mg}}{69,59 \text{ U/mg}} = 1,19$$

Por tanto, el grado de purificación en la fracción 17 de la cromatografía de filtración en gel, con respecto a la actividad caseinolítica, es de 1,19 veces.

ANEXO F

Cromatogramas obtenidos para los extractos de toronche (*Vasconcella stipulata*)

En la Figura F.1, se muestra el cromatograma correspondiente al proceso de purificación por cromatografía de filtración en gel, con el extracto semipurificado de látex de toronche, llevado a cabo en las condiciones que se especifican en la Tabla 2.1.

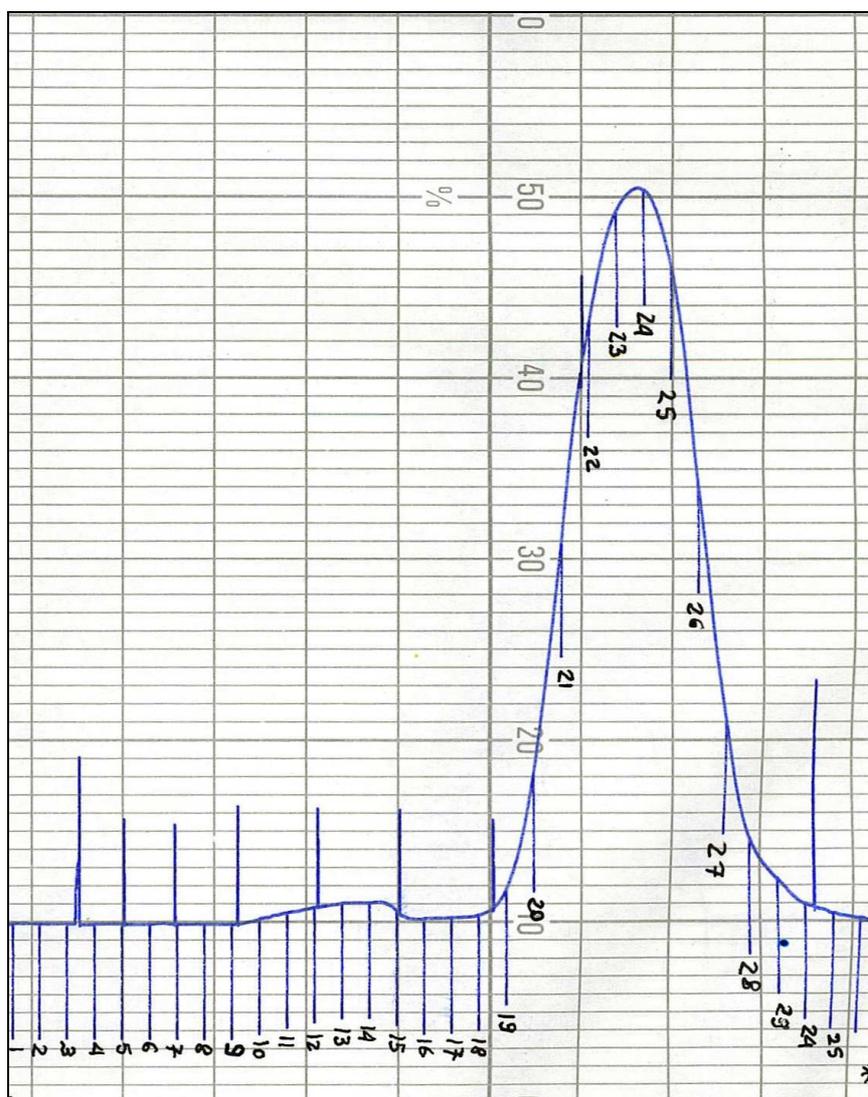


Figura F.1. Cromatograma obtenido de la filtración en gel del extracto semipurificado de látex de toronche (*V. stipulata*)

En la Figura F.2, se muestra el cromatograma correspondiente al proceso de purificación por cromatografía de intercambio iónico, con el lote formado por las fracciones más activas de la filtración en gel, para el látex de toronche, que se llevó a cabo en las condiciones que se especifican en la Tabla 2.2.

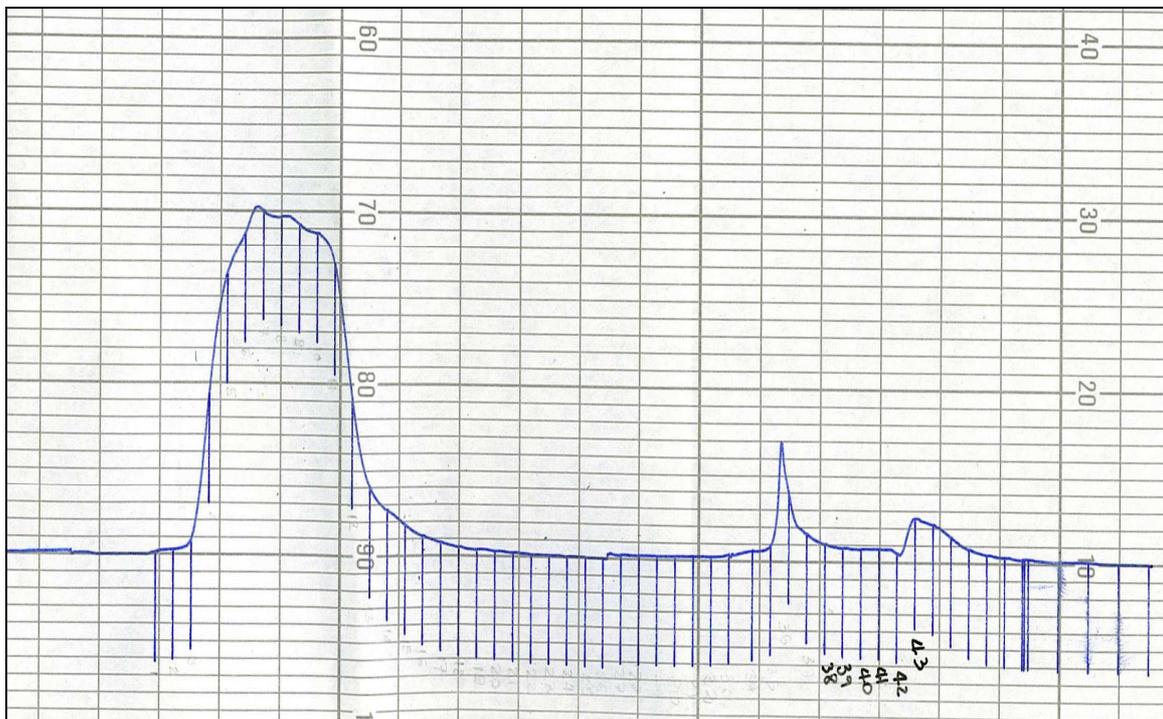


Figura F.2. Cromatograma obtenido de la cromatografía de intercambio iónico con el lote de fracciones más activas, purificadas por filtración en gel, para el látex de toronche (*V. stipulata*)

ANEXO G

Valores de las mediciones realizadas para determinar la concentración proteica, las actividades caseinolítica, esterásica y proteolítica con BApNA de los extractos y fracciones obtenidos en el estudio

Tabla G.1. Valores de las mediciones realizadas para determinar la concentración proteica y la actividad caseinolítica de los extractos acuosos preparados a partir de látex de chamburo, a diferentes temperaturas de secado

Temperatura de secado	Rep.	Extracto acuoso		Actividad caseinolítica				Lectura caseína (DO280)
		DO280	factor dilución	Muestra 1 (DO280)	Muestra 2 (DO280)	Blanco 1 (DO280)	Blanco 2 (DO280)	
40° C	1	0,317	10	1,130	1,090	0,123	0,124	5,69
	2	0,324	10	1,200	1,150	0,126	0,125	
55° C	1	0,318	10	0,962	0,956	0,124	0,126	
	2	0,321	10	0,967	0,971	0,125	0,124	

Tabla G.2. Valores de las mediciones realizadas para determinar la concentración proteica y la actividad caseinolítica de los extractos acuosos preparados a partir de látex de babaco, a diferentes temperaturas de secado

Temperatura de secado	Rep.	Extracto acuoso		Actividad caseinolítica				Lectura caseína (DO280)
		DO280	factor dilución	Muestra 1 (DO280)	Muestra 2 (DO280)	Blanco 1 (DO280)	Blanco 2 (DO280)	
40° C	1	0,265	10	0,486	0,469	0,123	0,124	5,69
	2	0,261	10	0,504	0,483	0,126	0,125	
55° C	1	0,263	10	0,417	0,411	0,124	0,126	
	2	0,264	10	0,412	0,419	0,125	0,124	

Tabla G.3. Valores de las mediciones realizadas para determinar la concentración proteica y la actividad caseinolítica de los extractos acuosos preparados a partir de látex fluido y látex coagulado de chamburo

Tipo de látex	Rep.	Extracto acuoso		Actividad caseinolítica				Lectura caseína (DO280)
		DO280	f dilución	Muestra 1 (DO280)	Muestra 2 (DO280)	Blanco 1 (DO280)	Blanco 2 (DO280)	
Fluido	1	0,317	10	1,130	1,090	0,123	0,124	5,69
	2	0,323	10	1,200	1,150	0,126	0,125	
Coagulado	1	0,282	10	0,908	0,914	0,121	0,122	5,72
	2	0,288	10	0,919	0,922	0,122	0,120	

Tabla G.4. Valores de las mediciones realizadas para determinar la concentración proteica y la actividad caseinolítica de los extractos acuosos preparados a partir de látex fluido y látex coagulado de babaco

Tipo de látex	Rep.	Extracto acuoso		Actividad caseinolítica				Lectura caseína (DO280)
		DO280	f dilución	Muestra 1 (DO280)	Muestra 2 (DO280)	Blanco 1 (DO280)	Blanco 2 (DO280)	
Fluido	1	0,265	10	0,487	0,476	0,124	0,123	5,69
	2	0,261	10	0,505	0,493	0,125	0,126	
Coagulado	1	0,232	10	0,426	0,418	0,122	0,121	5,72
	2	0,235	10	0,415	0,411	0,120	0,122	

Tabla G.5. Valores de las mediciones realizadas para determinar la concentración proteica y la actividad caseinolítica de los extractos acuosos preparados con 3 semanas de diferencia, a partir de látex de chamburo almacenado en congelación

Tipo de látex	Rep.	Extracto acuoso		Actividad caseinolítica				Lectura caseína (DO280)
		DO280	f dilución	Muestra 1 (DO280)	Muestra 2 (DO280)	Blanco 1 (DO280)	Blanco 2 (DO280)	
Fluido	1	0,317	10	1,160	1,110	0,123	0,124	5,69
	2	0,323	10	1,200	1,150	0,126	0,125	
Coagulado	1	0,321	10	1,150	1,110	0,117	0,116	5,78
	2	0,316	10	1,150	1,090	0,118	0,116	

Tabla G.6. Valores de las mediciones realizadas para determinar la concentración proteica y la actividad caseinolítica de los extractos acuosos preparados con 3 semanas de diferencia, a partir de látex de babaco almacenado en congelación

Tipo de látex	Rep.	Extracto acuoso		Actividad caseinolítica				Lectura caseína (DO280)
		DO280	f dilución	Muestra 1 (DO280)	Muestra 2 (DO280)	Blanco 1 (DO280)	Blanco 2 (DO280)	
Fluido	1	0,265	10	0,487	0,476	0,122	0,125	5,69
	2	0,261	10	0,505	0,493	0,125	0,126	
Coagulado	1	0,262	10	0,481	0,471	0,118	0,115	5,78
	2	0,266	10	0,482	0,488	0,117	0,117	

Tabla G.7. Valores de las mediciones realizadas para determinar la concentración proteica y la actividad caseinolítica de los extractos acuosos preparados con los látex secos de babaco, chamburo, col de monte y toronche

Especie	Rep.	Extracto acuoso		Actividad caseinolítica			
		DO ₂₈₀	f dilución	Muestra 1 (DO ₂₈₀)	Muestra 2 (DO ₂₈₀)	Blanco 1 (DO ₂₈₀)	Blanco 2 (DO ₂₈₀)
Babaco (<i>V. heilbornii</i> 'babaco')	1	0,275	10	0,331	0,119	0,115	0,331
	2	0,266	10	0,334	0,116	0,118	0,334
Chamburo (<i>V. cundinamarcensis</i>)	1	0,317	10	1,130	1,090	0,123	0,124
	2	0,323	10	1,200	1,150	0,126	0,125
Col de monte (<i>V. monoica</i>)	1	0,308	10	1,010	0,998	0,124	0,124
	2	0,312	10	1,020	0,991	0,122	0,123
Toronche (<i>V. stipulata</i>)	1	0,297	10	1,445	0,125	0,124	1,445
	2	0,301	10	1,451	0,124	0,123	1,451

Tabla G.8. Valores de las mediciones realizadas para determinar la concentración proteica y la actividad esterásica de los extractos acuosos preparados con los látex secos de babaco, chamburo, col de monte y toronche

Especie	Rep.	Extracto acuoso		Actividad esterásica	
		DO ₂₈₀	f dilución	(Δ DO ₃₄₈ / Δ t) Muestra	(Δ DO ₃₄₈ / Δ t) Blanco
Babaco (<i>V. heilbornii</i> 'babaco')	1	0,275	10	0,019	0,005
	2	0,266	10	0,020	0,005
Chamburo (<i>V. cundinamarcensis</i>)	1	0,317	10	0,027	0,005
	2	0,323	10	0,028	0,006
Col de monte (<i>V. monoica</i>)	1	0,308	10	0,028	0,005
	2	0,312	10	0,027	0,005
Toronche (<i>V. stipulata</i>)	1	0,297	10	0,029	0,005
	2	0,301	10	0,028	0,005

Tabla G.9. Valores de las mediciones realizadas para determinar la concentración proteica y la actividad proteolítica con BApNA de los extractos acuosos preparados con los látex secos de babaco, chamburo, col de monte y toronche

Especie	Rep.	Extracto acuoso		Actividad BApNA	
		DO ₂₈₀	f dilución	($\Delta DO_{400}/\Delta t$) Muestra	($\Delta DO_{400}/\Delta t$) Blanco
Chamburo (<i>V. cundinamarcensis</i>)	1	0,362	10	0,186	0,001
	2	0,358	10	0,185	0,001
Col de monte (<i>V. monoica</i>)	1	0,385	10	0,179	0,001
	2	0,377	10	0,176	0,001
Toronche (<i>V. stipulata</i>)	1	0,346	10	0,279	0,001
	2	0,353	10	0,290	0,001

Tabla G.10. Valores de las mediciones realizadas para determinar la concentración proteica y la actividad caseinolítica de los extractos semipurificados correspondientes a los látex de chamburo, col de monte y toronche

Especie	Rep.	Extracto semipurificado		Actividad caseinolítica			
		DO ₂₈₀	f dilución	Muestra 1 (DO ₂₈₀)	Muestra 2 (DO ₂₈₀)	Blanco 1 (DO ₂₈₀)	Blanco 2 (DO ₂₈₀)
Chamburo (<i>V. cundinamarcensis</i>)	1	0,181	5	0,521	0,509	0,158	0,153
	2	0,184	5	0,593	0,532	0,155	0,160
Col de monte (<i>V. monoica</i>)	1	0,161	5	0,476	0,484	0,150	0,156
	2	0,167	5	0,482	0,473	0,159	0,151
Toronche (<i>V. stipulata</i>)	1	0,156	5	0,646	0,653	0,152	0,157
	2	0,160	5	0,655	0,659	0,150	0,155

Tabla G.11. Valores de las mediciones realizadas para determinar la concentración proteica y la actividad esterásica de los extractos semipurificados correspondientes a los látex de babaco, chamburo, col de monte y toronche

Especie	Rep.	Extracto semipurificado		Actividad esterásica	
		DO ₂₈₀	f dilución	(Δ DO ₃₄₈ / Δ t) Muestra	(Δ DO ₃₄₈ / Δ t) Blanco
Chamburo (<i>V. cundinamarcentis</i>)	1	0,181	5	0,0130	0,0050
	2	0,184	5	0,0137	0,0053
Col de monte (<i>V. monoica</i>)	1	0,161	5	0,0113	0,0050
	2	0,167	5	0,0120	0,0050
Toronche (<i>V. stipulata</i>)	1	0,156	5	0,0117	0,0047
	2	0,160	5	0,0120	0,0050

Tabla G.12. Valores de las mediciones realizadas para determinar la concentración proteica y la actividad proteolítica con BApNA de los extractos semipurificados correspondientes a los látex de babaco, chamburo, col de monte y toronche

Especie	Rep.	Extracto semipurificado		Actividad BApNA	
		DO ₂₈₀	f dilución	(Δ DO ₄₀₀ / Δ t) Muestra	(Δ DO ₄₀₀ / Δ t) Blanco
Chamburo (<i>V. cundinamarcentis</i>)	1	0,181	10	0,1393	0,001
	2	0,192	10	0,1400	0,001
Col de monte (<i>V. monoica</i>)	1	0,169	10	0,1320	0,001
	2	0,176	10	0,1297	0,001
Toronche (<i>V. stipulata</i>)	1	0,169	10	0,2393	0,001
	2	0,173	10	0,2413	0,001

Tabla G.13. Valores de las mediciones realizadas para determinar la concentración proteica y la actividad caseinolítica de las fracciones resultantes de la cromatografía de filtración en gel del extracto semipurificado de látex de toronche

Fracción	Concentración proteica (DO280)	Actividad Caseinolítica			
		Muestra 1 (DO280)	Muestra 2 (DO280)	Blanco 1 (DO280)	Blanco 2 (DO280)
1	0,000	0,067	0,067	0,067	0,067
2	0,000	0,067	0,067	0,067	0,067
3	0,020	0,078	0,076	0,078	0,076
4	0,045	0,064	0,072	0,064	0,071
5	0,058	0,066	0,071	0,065	0,070
6	0,066	0,148	0,146	0,146	0,145
7	0,071	0,119	0,119	0,118	0,116
8	0,073	0,151	0,150	0,148	0,149
9	0,076	0,147	0,142	0,143	0,140
10	0,036	0,065	0,071	0,063	0,071
11	0,005	0,068	0,068	0,068	0,068
12	0,004	0,068	0,068	0,068	0,068
13	0,004	0,068	0,068	0,068	0,068
14	0,000	0,067	0,067	0,067	0,067
15	0,045	0,140	0,144	0,137	0,141
16	0,213	0,239	0,235	0,153	0,153
17	0,481	0,358	0,364	0,106	0,101
18	0,724	0,814	0,803	0,214	0,202
19	0,888	0,831	0,845	0,118	0,121
20	1,001	0,806	0,801	0,199	0,211
21	0,990	0,659	0,641	0,119	0,122
22	0,854	0,756	0,720	0,193	0,182
23	0,563	0,523	0,448	0,128	0,130
24	0,292	0,315	0,315	0,187	0,184
25	0,127	0,147	0,144	0,124	0,127
26	0,072	0,140	0,142	0,139	0,137
27	0,047	0,066	0,073	0,064	0,070
28	0,029	0,070	0,070	0,068	0,069
29	0,014	0,078	0,076	0,078	0,075
30	0,004	0,067	0,067	0,067	0,067
31	0,001	0,067	0,067	0,067	0,067
32	0,000	0,067	0,067	0,067	0,067

Tabla G.14. Valores de las mediciones realizadas para determinar la concentración proteica y la actividad esterásica de las fracciones resultantes de la cromatografía de filtración en gel del extracto semipurificado de látex de toronche

Fracción	Concentración proteica (DO ₂₈₀)	Actividad Esterásica	
		(Δ DO ₃₄₈ / Δ t) Muestra	(Δ DO ₃₄₈ / Δ t) Blanco
1	0,000	0,005	0,005
2	0,000	0,005	0,005
3	0,020	0,005	0,005
4	0,045	0,005	0,005
5	0,058	0,005	0,005
6	0,066	0,005	0,005
7	0,071	0,005	0,005
8	0,073	0,005	0,005
9	0,076	0,005	0,005
10	0,036	0,005	0,005
11	0,005	0,005	0,005
12	0,004	0,005	0,005
13	0,004	0,005	0,005
14	0,000	0,005	0,005
15	0,045	0,005	0,005
16	0,213	0,006	0,005
17	0,481	0,006	0,005
18	0,724	0,007	0,005
19	0,888	0,011	0,005
20	1,001	0,013	0,005
21	0,990	0,014	0,005
22	0,854	0,013	0,005
23	0,563	0,010	0,005
24	0,292	0,006	0,005
25	0,127	0,005	0,005
26	0,072	0,005	0,005
27	0,047	0,005	0,005
28	0,029	0,005	0,005
29	0,014	0,005	0,005
30	0,004	0,005	0,005
31	0,001	0,005	0,005
32	0,000	0,005	0,005

Tabla G.15. Valores de las mediciones realizadas para determinar la concentración proteica y la actividad caseinolítica de las fracciones resultantes de la cromatografía de intercambio iónico del extracto de látex de toronche purificado por filtración en gel

Fracción	Concentración proteica (DO ₂₈₀)	Actividad Caseinolítica			
		Muestra 1 (DO ₂₈₀)	Muestra 2 (DO ₂₈₀)	Blanco 1 (DO ₂₈₀)	Blanco 2 (DO ₂₈₀)
2	0,005	0,068	0,068	0,068	0,068
3	0,005	0,068	0,068	0,068	0,068
4	0,017	0,069	0,068	0,068	0,068
5	0,042	0,069	0,071	0,068	0,069
6	0,014	0,069	0,068	0,068	0,068
7	0,011	0,068	0,068	0,068	0,068
8	0,010	0,068	0,068	0,068	0,068
12	0,045	0,129	0,128	0,125	0,125
13	0,072	0,136	0,137	0,128	0,129
14	0,213	0,155	0,150	0,127	0,126
15	0,474	0,104	0,120	0,064	0,061
16	0,671	0,169	0,167	0,049	0,049
17	0,693	0,169	0,169	0,049	0,049
18	0,615	0,140	0,135	0,050	0,050
19	0,487	0,103	0,095	0,058	0,049
20	0,355	0,086	0,081	0,058	0,059
21	0,127	0,131	0,129	0,125	0,123
22	0,029	0,127	0,127	0,127	0,126
23	0,007	0,068	0,068	0,068	0,068
24	0,006	0,068	0,068	0,068	0,068
25	0,006	0,068	0,068	0,068	0,068
28	0,039	0,128	0,124	0,126	0,123
29	0,758	0,187	0,189	0,123	0,123
30	0,430	0,124	0,123	0,121	0,117
31	0,086	0,132	0,131	0,129	0,129
32	0,058	0,130	0,129	0,127	0,127
33	0,044	0,126	0,127	0,125	0,125
34	0,028	0,128	0,129	0,128	0,127
35	0,030	0,126	0,127	0,125	0,126
36	0,075	0,132	0,131	0,129	0,129
37	0,062	0,131	0,131	0,129	0,129
38	0,041	0,126	0,126	0,125	0,125
39	0,033	0,126	0,127	0,125	0,126
40	0,028	0,126	0,126	0,125	0,126
41	0,026	0,126	0,126	0,125	0,126
42	0,013	0,068	0,068	0,068	0,068
43	0,015	0,068	0,068	0,068	0,068
44	0,012	0,068	0,068	0,068	0,068
45	0,013	0,068	0,068	0,068	0,068
46	0,006	0,068	0,068	0,068	0,068

No se incluyen las fracciones cuya concentración proteica (DO₂₈₀) fue menor que 0,005.

Tabla G.16. Valores de las mediciones realizadas para determinar la concentración proteica y la actividad esterásica de las fracciones resultantes de la cromatografía de intercambio iónico del extracto de látex de toronche purificado por filtración en gel

Fracción	Concentración proteica (DO ₂₈₀)	Actividad Esterásica	
		(Δ DO ₃₄₈ / Δ t) Muestra	(Δ DO ₃₄₈ / Δ t) Blanco
2	0,005	0,0053	0,0053
3	0,005	0,0053	0,0053
4	0,017	0,0053	0,0053
5	0,042	0,0053	0,0053
6	0,014	0,0053	0,0053
7	0,011	0,0053	0,0053
8	0,010	0,0053	0,0053
12	0,045	0,0053	0,0053
13	0,072	0,0053	0,0053
14	0,213	0,0057	0,0053
15	0,474	0,0063	0,0053
16	0,671	0,0073	0,0053
17	0,693	0,0080	0,0053
18	0,615	0,0080	0,0053
19	0,487	0,0067	0,0053
20	0,355	0,0057	0,0053
21	0,127	0,0053	0,0053
22	0,029	0,0053	0,0053
23	0,007	0,0053	0,0053
24	0,006	0,0053	0,0053
25	0,006	0,0053	0,0053
28	0,039	0,0053	0,0053
29	0,758	0,0053	0,0053
30	0,430	0,0057	0,0053
31	0,086	0,0053	0,0053
32	0,058	0,0053	0,0053
33	0,044	0,0053	0,0053
34	0,028	0,0053	0,0053
35	0,030	0,0053	0,0053
36	0,075	0,0053	0,0053
37	0,062	0,0053	0,0053
38	0,041	0,0053	0,0053
39	0,033	0,0053	0,0053
40	0,028	0,0053	0,0053
41	0,026	0,0053	0,0053
42	0,013	0,0053	0,0053
43	0,015	0,0053	0,0053
44	0,012	0,0053	0,0053
45	0,013	0,0053	0,0053
46	0,006	0,0053	0,0053

No se incluyen las fracciones cuya concentración proteica (DO₂₈₀) fue menor que 0,005.

Tabla G.17. Valores de las mediciones realizadas para determinar la concentración proteica y la actividad proteolítica con BApNA de las fracciones resultantes de la cromatografía de filtración en gel del extracto semipurificado de látex de toronche

Fracción	Concentración proteica (DO ₂₈₀)	Actividad BApNA	
		(Δ DO ₄₀₀ / Δ t) Muestra	(Δ DO ₄₀₀ / Δ t) Blanco
1	0,000	0,001	0,001
2	0,005	0,001	0,001
3	0,002	0,001	0,001
4	0,020	0,001	0,001
5	0,011	0,001	0,001
6	0,007	0,001	0,001
7	0,027	0,001	0,001
8	0,026	0,001	0,001
9	0,032	0,001	0,001
10	0,052	0,002	0,001
11	0,053	0,002	0,001
12	0,062	0,002	0,001
13	0,074	0,003	0,001
14	0,078	0,003	0,001
15	0,038	0,002	0,001
16	0,020	0,001	0,001
17	0,028	0,001	0,001
18	0,041	0,002	0,001
19	0,155	0,004	0,001
20	0,632	0,013	0,001
21	0,972	0,068	0,001
22	1,260	0,135	0,001
23	1,340	0,151	0,001
24	1,360	0,217	0,001
25	1,270	0,141	0,001
26	0,785	0,099	0,001
27	0,478	0,012	0,001
28	0,164	0,003	0,001
29	0,131	0,002	0,001
30	0,066	0,002	0,001
31	0,028	0,001	0,001
32	0,011	0,001	0,001
33	0,001	0,001	0,001

Tabla G.18. Valores de las mediciones realizadas para determinar la concentración proteica y la actividad proteolítica con BApNA de las fracciones resultantes de la cromatografía de intercambio iónico del extracto de látex de toronche purificado por filtración en gel

Fracción	Concentración proteica (DO ₂₈₀)	Actividad BApNA	
		($\Delta DO_{400}/\Delta t$) Muestra	($\Delta DO_{400}/\Delta t$) Blanco
2	0,011	0,001	0,001
3	0,017	0,001	0,001
4	0,023	0,001	0,001
5	0,008	0,001	0,001
6	0,002	0,001	0,001
8	0,118	0,004	0,001
9	0,537	0,009	0,001
10	0,913	0,015	0,001
11	1,201	0,026	0,001
12	1,310	0,050	0,001
13	1,259	0,063	0,001
14	1,117	0,075	0,001
15	1,005	0,068	0,001
16	0,789	0,067	0,001
17	0,339	0,012	0,001
18	0,162	0,003	0,001
19	0,101	0,002	0,001
20	0,042	0,002	0,001
21	0,035	0,001	0,001
22	0,004	0,001	0,001
23	0,001	0,001	0,001
24	0,001	0,001	0,001
27	0,010	0,001	0,001
28	0,209	0,002	0,001
29	0,203	0,002	0,001
30	0,062	0,002	0,001
31	0,022	0,001	0,001
32	0,010	0,001	0,001
33	0,006	0,001	0,001
34	0,004	0,001	0,001
35	0,040	0,001	0,001
36	0,093	0,002	0,001
37	0,067	0,002	0,001
38	0,041	0,001	0,001
39	0,005	0,001	0,001

No se incluyen las fracciones cuya concentración proteica (DO₂₈₀) fue igual a 0,000.

Tabla G.19. Valores de las mediciones realizadas para determinar el efecto del pH sobre la actividad proteolítica con BApNA de la fracción más activa del extracto de látex de toronche purificado por intercambio iónico

pH	Actividad BApNA	
	($\Delta DO_{400}/\Delta t$) Muestra	($\Delta DO_{400}/\Delta t$) Blanco
5,5	0,007	0,001
6,5	0,021	0,001
7,0	0,003	0,001
7,5	0,024	0,001
8,5	0,018	0,001
9,5	0,014	0,001
10,5	0,003	0,001

Tabla G.20. Valores de las mediciones realizadas para determinar el efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica con BApNA de la fracción más activa del extracto de látex de toronche purificado por intercambio iónico

Temperatura ° C	Actividad BApNA	
	($\Delta DO_{400}/\Delta t$) Muestra	($\Delta DO_{400}/\Delta t$) Blanco
20	0,015	0,001
30	0,021	0,001
37,5	0,029	0,001
45	0,039	0,001
50	0,042	0,001
60	0,026	0,001
70	0,011	0,001

Tabla G.21. Valores de las mediciones realizadas para determinar el efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad proteolítica con BApNA de la fracción más activa del extracto de látex de toronche purificado por intercambio iónico

Concentración de sustrato (mg/ml)	Actividad BApNA	
	($\Delta DO_{400}/\Delta t$) Muestra	($\Delta DO_{400}/\Delta t$) Blanco
1	0,011	0,001
3	0,016	0,001
5	0,026	0,001
7	0,030	0,001
9	0,031	0,001
10	0,034	0,001